Goedbloed, C.A.G.
1919,

INSTITUUT VOOR TROPISCHE HYGIENE

THESIS. AMSTERDAM.

ONDERZOEKINGEN OVER DE ELECTIVITEIT VAN DEN CHOLERAVOEDINGSBODEM VAN DIEUDONNÉ

1917

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO CALIF.

C. A. G. GOEDBLOED

Parasitic Protozoa

LANE
MEDICAL LIBRARY
SEAL OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
SEMPER VIRENS
1885
Gift of
Mr. William Wreden

ONDERZOEKINGEN OVER DE ELECTIVITEIT VAN DEN CHOLERAVOEDINGSBODEM VAN DIEUDONNÉ

Onderzoekingen over de Electiviteit van den Cholera-voedingsbodem van Dieudonné

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN **DOCTOR IN DE GENEESKUNDE**, AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS PROF. DR. K. KUIPER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN, IN DE AULA DER UNIVERSITEIT, OP **DONDERDAG 6 MAART 1919**, DES NAMIDDAGS TE HALFVIJF,

DOOR CORNELIS ADRIANUS GERARDUS GOEDBLOED, ARTS, GEBOREN
:: TE SOEMENAP (N. O. I.) ::

AMSTERDAM — J. H. DE BUSSY — 1919

AAN MIJN VROUW
AAN MIJNE OUDERS

Bij de voleindiging van dit proefschrift is het mij een voorrecht U, Hoogleeraren der Geneeskundige Faculteit te Leiden, een woord van dank te brengen voor de klinische grondslagen die gij mij gaaft voor mijn toekomstige loopbaan.

Ook U, Professoren der Philosophische Faculteit betuig ik mijn dank voor het onderwijs.

Zeer groote erkentelijkheid ben ik verschuldigd aan U, Hooggeleerde VAN LOGHEM, *Hooggeachte Promotor, voor den steun bij de bewerking van dit proefschrift, voor de opbouwende en kritische leiding die ik van U mocht ontvangen. Het onderricht in tropische vraagstukken, dat ik aan het Instituut voor Tropische Hygiëne genoten heb, zal ik steeds blijven waardeeren, en de tijd welke ik daar doorbracht zal mij als een aangename herinnering bijblijven.*

U, Hooggeleerde KUENEN, *en U, Zeergeleerde* SCHUURMANS STEKHOVEN *betuig ik mijn dank voor het vele dat ik van U mocht leeren op pathologisch, klinisch en zoölogisch gebied.*

Eveneens U, zeer ervaren DE HAAN, *mijn dank voor alle hulp bij de chemische moeilijkheden, die zich bij mijne studie hebben voorgedaan.*

Ten slotte breng ik mijn dank aan allen van wie ik medewerking ondervond bij mijn arbeid, en wèl in het bijzonder aan Dr. LEOPOLD *en aan de dames* SOHLBERG *en* VEENHOVEN.

INHOUD

BLZ.

HOOFDSTUK I

KORT OVERZICHT DER POGINGEN TOT SAMENSTELLING VAN EEN VOOR DEN CHOLERAVIBRIO BIJZONDER GESCHIKTEN VOEDINGSBODEM 1

HOOFDSTUK II

DE BLOEDALKALI-AGAR IN HAAR VERSCHILLENDE GEDAANTEN 11

HOOFDSTUK III

VERGELIJKENDE PROEVEN OVER DE VERANDERINGEN DER ALCALESCENTIE, DE ELECTIVITEIT EN DE ONMIDDELLIJKE BRUIKBAARHEID.

§ 1. Inleiding. 22
§ 2. Verschillende hoeveelheden alkali en electiviteit . 28
§ 3. Steriliseeren, alcalescentie en electiviteit. 34
§ 4. Bewaren, alcalescentie en electiviteit 37
§ 5. Het doorleiden van gassen. 40
§ 6. Dunne en dikke platen vergeleken 43
§ 7. Toevoegen van alkali aan bouillonagar 44

HOOFDSTUK IV

DE INVLOED VAN HET BLOED 47

HOOFDSTUK V

PROEVEN OVER DE BETEEKENIS VAN HET AMMONIAK.

§ 1. Inleiding. 50
§ 2. Vergelijking van ammoniakgehalte bij korter of langer steriliseeren en electiviteit. 53
§ 3. De electiviteit van dunne en dikke plaat vergeleken 56
§ 4. Toevoegen van ammoniak aan bouillonagar en aan niet-electieve mengsels. 61
§ 5. Het steriliseeren en bewaren van bloedalkali-mengsels in open en toegesmolten buizen 71

HOOFDSTUK VI

SLOTOPMERKINGEN 75

HOOFDSTUK I.

Kort overzicht der pogingen tot samenstelling van een voor den choleravibrio bijzonder geschikten voedingsbodem.

In tal van gevallen kan de diagnose cholera niet gesteld worden zonder bacteriologische onderzoekingen; ter voorbereiding van maatregelen tot beteugeling der ziekte is het noodig den verwekker onder het microscoop te brengen.

De praktijk der cholerabestrijding verlangt dus een voedingsbodem waarop de choleravibrio gemakkelijk kan worden herkend, beter nog een electieve, die den groei van andere micro-organismen belemmert.

Zulk een electieven voedingsbodem voor choleravibrionen gaf Dieudonné in 1909; deze voedingsbodem bestaat behalve uit bloed, uit kaliloog en bouillonagar.

Het bloed was reeds tevoren (1901) door Heim gebruikt ter bevordering van den groei der choleravibrionen, terwijl deze bij zijn proefnemingen tevens vond, dat op zijn bloedvoedingsbodem de overige micro-organismen min of meer werden tegengehouden.

Eerst gebruikte HEIM alleen de bloedkoek, later het gansche bloed van varkens, runderen en paarden. Hij voegde een gelijke hoeveelheid water toe en liet dit in waterdamp van 100° staan, waarna hij door filtreeren een zwak alcalische vloeistof verkreeg, die voor den groei der vibrionen zeer goed bleek te zijn, beter nog dan peptonwater; de indolreactie viel sterker positief uit en er werd een dikker vliesje gevormd. Hij bezigde dit bloeddecoct voor de bereiding van gelatine en agarplaten en constateerde ook hierop een beteren groei. De kolonie's werden eenige malen grooter dan op de vroeger gebruikte voedingsbodems en tevens merkte hij op, dat vele andere bakteriën in groei achterbleven.

Ook was reeds vastgesteld dat een hoog looggehalte door den choleravibrio veel beter wordt verdragen dan door andere microben.

DIEUDONNÉ nu voegde deze beide bovengenoemde stoffen tezamen, en combineerde dus het bloed met een loog van hoog gehalte.

De bereiding van zijn voedingsbodem is uitermate eenvoudig: het bloed (van paard, varken, rund, geit, gans, cavia, konijn) moet gedefibrineerd zijn, en als loog wordt een normaal kaliloog oplossing gebruikt. In gelijke hoeveelheden worden beide bij elkaar gevoegd, in de autoclaaf gesteriliseerd gedurende een half tot één uur, waarna het mengsel gereed is. Hiervan giet men platen met 3 of 4 % voedingsagar in de verhouding van 3 : 7 agar. De resultaten, bereikt met een goed samengestelden en goed bereiden DIEUDONNÉ-agar zijn waarlijk zeer fraai.

Latere onderzoekers hebben een veel meer ingewikkelden gang van zaken aangegeven; de eerste publicatie hierover is van NEUFELD und WOITHE. Hun gecompliceerde wijze van doen evenwel is overbodig, wat door anderen is bevestigd.

De voedingsbodem van DIEUDONNÉ kon spoedig aan de praktijk getoetst worden en vele onderzoekers hebben haar gebruikt; en ofschoon men er veel meer tevreden over was dan over de vroegere hulpmiddelen, kwamen toch al spoedig bezwaren, die zich bij het gebruik van laboratoriumstammen niet of veel minder hadden voorgedaan.

KABESHIMA heeft later bij zijn onderzoekingen ook gevonden dat er in het algemeen onderscheid was tusschen de resultaten van met echte en kunstmatige cholerafaeces bestreken platen.

Met het ontdekken der bezwaren was de drang ontstaan om hen te voorkomen, en talrijk zijn de modificatie's geweest die voor den DIEUDONNÉ-agar zijn aangegeven, waarover de meeningen ook weer zeer verschillen, al naar gelang de onderzoekers en de stammen waarmede zij werkten. Want reeds DEELEMAN vond cholerastammen die zich onderscheiden door een, soms belangrijk, verschil in alkali-behoefte.

De bloedalkaliagar in haar verschillende toepassingen zal ik in het volgende hoofdstuk bespreken, hier bepaal ik mij er toe slechts de voornaamste vervangers van den voedingsbodem volgens DIEUDONNÉ in herinnering te brengen, die in de laatste

jaren zijn aangegeven en die door volgende onderzoekers zijn beproefd.

Aronson gaf in 1915 een alcalischen saccharose-fuchsine-voedingsbodem aan, waarin twee voorwaarden gecombineerd zijn toegepast, nl. *a* V. cholerae kan een hoog alcaligehalte verdragen; en *b* bij aanwezigheid van rietsuiker en zetmeel hergeeft V. cholerae aan ontkleurde fuchsine de kleur.

Zijn recept is als volgt: voeg bij 100 c.c. warme 3 % bouillonagar 6 c.c. van een 10 % oplossing van carbon. natric. sicc. Laat dit 15 minuten staan bij 100° en voeg terwijl het nog heet is, toe: 5 c.c. 20 % rietsuikeroplossing, 5 c.c. 20 % zetmeeloplossing en 0.4 c.c. verzadigde alcoholische fuchsineoplossing, die niet te oud mag zijn. Het mengsel wordt ten slotte ontkleurd door 2 c.c. 10 % natriumsulfietoplossing. Er komt een bezinksel; van de bovenstaande vloeistof worden platen gegoten, die na drogen (gedurende $^1/_2$ uur ondersteboven bij 50° C.) onmiddellijk voor gebruik gereed zijn, en een paar dagen in het donker bewaard kunnen worden. Aronson geeft als resultaat op dat er een goede groei der choleravibrionen in 10 uur plaats vindt, practisch evenwel na 20 uur, omdat de kolonie's eerst dan de goede grootte en roode kleur hebben.

De colibacillen worden min of meer sterk geremd en de voedingsbodem had ook reeds in de praktijk voldaan.

Behalve de onmiddellijke bruikbaarheid bezit deze voedingsbodem het voordeel dat de bouillonagar als zoodanig in voorraad kan worden gehouden en

de overige stoffen in tabletten, hetgeen voor een mobiel laboratorium gemakkelijk is. Een voordeel boven den bodem van DIEUDONNÉ bezit dit voedingsmedium nog hierin, dat de agglutinabiliteit der vibrionen niet achteruit gaat.

SCHEUERMANN en FELLMER zijn over dezen voedingsbodem tevreden, ofschoon de kolonie's der niet-choleravibrionen niet te onderscheiden zijn van de cholerakolonie. De niet-choleravibrionen vertoonen evenwel geen neiging den V. cholerae van de platen te verdringen, zelfs wanneer die vibrionen in een mengsel overheerschen.

BOETTICHER die den voedingsbodem van ARONSON beproefde met kunstmatige cholerafaeces, vond geen weelderigen groei van den V. cholerae; de voedingsbodem was niet in staat dien van DIEUDONNÉ te vervangen. Zou deze evenwel niet kunnen bereid worden, dan kan ARONSON's voedingsbodem er voor in de plaats komen, omdat de coligroei wordt geremd, de kleur der cholerakolonie's een aanwijzer is, en de agglutinatie der choleravibrionen beter dan op den DIEUDONNÉ-agar.

STERN vond den voedingsbodem van ARONSON staan boven dien van ESCH en van DIEUDONNÉ. Hij gebruikte reinculturen van verschillende darmbakteriën. Een moeilijkheid bij den voedingsbodem van ARONSON is de aanwezigheid van glycolytische fermenten in faeces en het bestaan van colibacillen die, ofschoon langzaam, de suiker splitsen en zoo cholerakolonie's kunnen nabootsen. Hij geeft een modificatie aan met pepton, die beter zou voldoen.

Castelli en Vigano keuren deze modificatie af en houden zich aan den oorspronkelijken voedingsbodem van Aronson. Volgens hen worden de moeilijkheden door de glycolytische fermenten veroorzaakt, door de verandering die Stern aangeeft, eerder grooter dan terzijde gesteld.

Volpino tenslotte zegt dat op de kleurverandering geen staat gemaakt kan worden; alle kolonie's moeten onderzocht worden en daarom vindt hij gewonen agar even goed.

Lange bereidde een voedingsbodem, waarvan het principe hierop berust, dat slechts enkele darmbakteriën in staat zijn in een sterk alcalische omgeving het zetmeel aan te tasten, wat zich demonstreert door het vormen van een grooten, scherp afgescheiden ronden transparanten kring rondom de cholerakolonie, te midden van den troebelen zetmeelagar. Verder is de groei der cholera-vibrionen zoo weelderig en karakteristiek, dat een verwisseling met andere faecale microben bijna onmogelijk is. Aldus Lange.

Als zetmeel bezigt hij rijstemeel; hiervan wordt een 5 % oplossing gemaakt. De alcalische agar bevat op 1000 c.c. voedingsagar, 40 c.c. 10 % soda-oplossing. Één deel der gesteriliseerde zetmeeloplossing gevoegd bij 6 deelen agar geeft het platenmateriaal dat wordt uitgegoten in schalen van 20 c.M. diameter. De faeces moet vóór het enten verdund worden, daar vooral bij diarrhoe nog al eens een diastase voorkomt, die storend werkt.

Behalve het karakteristieke uiterlijk, is nog een

voordeel dat de agglutinabiliteit der vibrionen niet gestoord is. De kring die door andere diastatische kiemen wordt gevormd, is niet zoo glashelder als van de cholera-kolonie, zoodat bij eenige oefening een verwarring niet mogelijk is, terwijl de cholera-kolonie's ook veel grooter zijn, na 2 dagen soms zelfs 4—5 m.M. groot kunnen worden met een kring van 25 m.M. diameter.

Boetticher zegt van Lange's voedingsbodem dat deze de kolonie's van den V. cholerae niet voldoende doet onderscheiden van die van een aantal andere faecesbacteriën, die eveneens zetmeel omzetten.

Later geeft Lange, in antwoord op de bezwaren, nog eens nadrukkelijk aan, dat het noodig is de faeces te verdunnen en de platen niet te dik te maken. Hij verklaart dat door de diastatische fermenten het onmiddellijk gebruik niet steeds zulke goede resultaten geeft als b.v. de voedingsbodem van Dieudonné, maar meent dat na voorafgaande aankweeking in peptonwater zijn alcalische stijfsel-voedingsbodem toch te verkiezen is, omdat hij een snelleren groei geeft, goed agglutineerende vibrionen en gemakkelijk te onderscheiden kolonie's.

Eveneens geeft hij de mogelijkheid aan van het gebruik van caseïne en melk als indicator (het proteolytisch ferment der choleravibrionen vormt een heldere zône om de kolonie's) en van een combinatie van caseïne en stijfsel, in welk geval alleen organismen, die èn diastatische èn proteolytische fermenten bezitten, een helderen kring

rondom de kolonie's zouden vormen. Behalve de vibrionen doet ook B. subtilis dit.

Hiermede heb ik de voornaamste niet-bloed-bevattende voedingsbodems beschreven, die ter vervanging van den voedingsbodem van DIEUDONNÉ zijn gepubliceerd.

Over de andere kan ik kort zijn. Zoo hebben TEAGUE AND TRAVIS een nutrose-saccharose-agar aangegeven met kleurcontrast door toevoeging van eosine en bismarckbruin, die geen bijzondere voordeelen bezit.

SEIFFERT en BAMBERGER hebben een poging gedaan om de goede eigenschappen van de voedingsbodems van DIEUDONNÉ en van ARONSON te combineeren. Daar de kleur van het haemoglobine storend werkt op het fuchsine, gebruikten zij gal. Hierdoor werd de groei van den V. cholerae bevorderd, die van de overige darmflora geremd. De gal wisselde evenwel zeer in werking, zoodat deze telkens van te voren beproefd zou moeten worden. Daarom werd chlorophyl gebezigd. Eenige gunstige resultaten werden bereikt, maar het bleek geen afdoende verbetering te zijn. BAUMGARTEN en LANGE-ZUCKERKANDL, die dezen voedingsbodem gebruikten, ontkennen de groei bevorderende werking van het chlorophyll; haematoporphyrine en haemine zouden 't wèl doen, en zij raden daarom een nieuwe modificatie van den voedingsbodem van ARONSON met deze stoffen aan.

CRENDIROPOULO en PANAYOTATOU hebben eveneens een voedingsbodem willen samenstellen die een snelleren choleragroei gaf met voldoende electieve eigen-

schappen. Zij geven de bereiding als volgt aan: 5 gram pepton (Witte of Chapoteau) worden opgelost in 190 c.c. water. Hierbij voegt men 10 c.c. van een 10% natronloogoplossing wanneer men pepton Chapoteau gebruikt heeft, en liever 8 c.c. als pepton-Witte gebezigd wordt.

Verwarm dit mengsel gedurende 3 tot 5 minuten waarna na afkoeling door papier wordt gefiltreerd. Steriliseer het filtraat na afkoeling gedurende een half uur bij 100° C.; en meng dan vier deelen van deze alcalische pepton met zes deelen van een neutrale pepton-keukenzout-agar van de volgende samenstelling:

3 gram agar
1 „ pepton
½ gram keukenzout
100 c.c. water.

Giet nu uit in schalen en men heeft een medium, volgens hen, voor onmiddellijk gebruik geschikt. Het is een kleurlooze plaat waarop de pyocyaneus kolonie goed te onderscheiden is. De alcalescentie van dit kweekmedium is veel lager dan van den Dieudonné'agar; de schrijvers zeggen evenwel dat het electieve eigenschappen bezit. In het laboratorium voor de gezondheidsleer te Amsterdam bleek van die electiviteit weinig, en PILON vond dat behalve V. cholera, ook B. coli, Staphylococcus aureus, watervibrio en B. pyocyaneus er goed op groeien.

Ook hierin kan men dus geen electieven voedingsbodem zien.

Ook noem ik nog de poging van KOEHLISCH en OTTO, die een zoetemelkschekaasagar bereid hebben; en van SOBEL die een voedingsbodem samenstelde waarin Pilsener bier vervat was.

HOOFDSTUK II.

De bloedalkali-agar in haar verschillende gedaanten.

Zooals reeds vermeld heeft HEIM het eerst het bloed gebruikt, als decoct, voor de bereiding van een choleravoedingsbodem, terwijl DIEUDONNÉ later is gevolgd met zijn bekend recept voor een electieve choleraplaat. Ofschoon deze laatste ongetwijfeld een zeer belangrijke aanwinst kan worden genoemd voor de bacteriologische choleradiagnostiek, is zij niet een ideale voedingsbodem. Spoedig kwamen dan ook aanmerkingen over de bruikbaarheid, de electieve werking, en de veranderingen, die de kolonie's ondergaan.

NEUFELD und WOITHE hebben den voedingsbodem nauwkeurig bestudeerd. Terwijl HUNTEMÜLLER $^1/_2$ uur laat steriliseeren, vinden de schrijvers $^3/_4$—1 uur beter, want het schijnt, zeggen zij, alsof door het langere koken de tot een bepaalden graad van alcalescentie voerende chemische omzettingen, die anders eerst na verloop van geruimen tijd tot stand komen en nog na het gieten der platen veranderingen geven, versneld worden, en een grootere gelijkmatigheid van den voedingsbodem geven. Verder is de samenstelling van het bloed wel niet

steeds constant, maar deze is niet van invloed op de goede eigenschappen van de plaat; de N-kaliloog verandert eenigszins bij lang staan in flesschen, maar eveneens zeer weinig. De grootste kans van fouten geeft de agar; deze moet vooral 3—4 % zijn, en van goede samenstelling wezen.

De platen laten zij eerst 10 min. open aan de lucht, daarop 15—24 uur omgekeerd en half open bij 37° staan, daarna 5—10 min. in een 60°-stoof, die af en toe even met versche lucht geventileerd moet worden. Om het tijdstip der bruikbaarheid te vervroegen voegden Neufeld und Woithe bij 100 cc. van de vloeibare bloedalkaliagar 2 cc. eener 10 % melkzuuroplossing om den overvloed loog te neutraliseeren en voor binding van het ammoniak. Deze platen kunnen dadelijk na vast worden in de 60°-stoof worden gezet en gebruikt, maar de electiviteit duurt niet lang.

Laubenheimer onderzocht de choleravibrionen, die op de bloedakaliplaat groeiden en vond, in vergelijking met de gewone voedingsagar-cultuur, dat zij niet meer zoo hoog agglutineeren; dat de bacteriolyse bij intraperitoneale inspuiting gelijk bleef; dat de beweeglijkheid vaak was toegenomen, ofschoon niet van alle stammen. Verder vond hij een ongunstigen invloed op vorm en kleurbaarheid; de vorm wordt niet zoo erg gewijzigd (een enkele maal polymorphie; meermalen korter en geen fraaie komma), de kleurbaarheid neemt vrij sterk af. Stokvis is over de agglutinabiliteit tevreden.

Hachla en Holobut verkiezen bloed van paarden

en varkens boven runder-, geiten-, konijnen-, cavia- en ganzenbloed.

De voedingsbodem is bovendien niet streng electief voor den V. cholerae; behalve deze groeien B. proteus vulgaris, B. pyocyaneus en B. faecalis alcaligenes meer of minder goed, eveneens, maar slechter, het Bacterium fluorescens non liquefaciens, volgens Glaser en Hachla. Voor de gewone en pathogene darmflora evenwel is de electiviteit zeer voldoende: B. typhosus en de dysenteriebacillen worden geheel geremd; maar bij het ouder worden van het bloedalkalimengsel gaat de electieve werking zeer achteruit.

Terwijl met een versch bereid mengsel de platen eerst na 24 uur bewaren te gebruiken zijn, wat voor het snel herkennen van een eerste cholerageval een bezwaar is, wordt bij langer bewaren van het mengsel de plaat op een zeker oogenblik aanstonds bruikbaar, tevens is echter de electiviteit teruggegaan. Bij dit rijpingsproces schijnen onbekende chemische omzettingen een rol te spelen; daarnaast is van veel invloed de inwerking van het koolzuur uit de lucht. Pilon heeft nl. aangetoond, dat het blootstellen aan een koolzuur-atmosfeer de plaat onmiddellijk bruikbaar maakt, terwijl het Nieuwenhuyse gelukte den tijd, die noodig was om een versch bereid Dieudonné-mengsel voor onmiddellijk gebruik geschikt te maken, zeer te bekorten door dat mengsel dikwijls flink met lucht te schudden, terwijl dan ook de electiviteit min of meer verloren ging. Dit bracht Van Loghem op het denkbeeld het mengsel te bedekken met een dikke laag paraffinum liquidum, waardoor de invloed

der lucht wordt uitgeschakeld. Van twee mengsels, één zonder en één met een paraffinelaag, bleek het eerste na 7 maanden niet meer electief te zijn, het tweede nog wel. Bedekte mengsels waren na 9 dagen geschikt voor onmiddellijk gebruik, voor platengieten moet men met een pipet de noodige hoeveelheid afzuigen.

HALL heeft bloedalkalimengsels in flesschen bewaard, en van deze eenige afgesloten met een wattenprop (*a*), andere met een rubberdop (*b*). Na 3 weken goot hij er platen van, die verschillende tijden aan de lucht blootgesteld werden; op die van 't eerste mengsel (*a*) werd na 3 uur een goede cholera groei verkregen, op het tweede (*b*) eerst na 6 uur.

De fouten en ongerieven, die den voedingsbodem van DIEUDONNÉ aankleven, zijn aanleiding geweest tot pogingen dezen te modificeeren, waarbij door de onderzoekers is vastgehouden aan het principe het bloed, of de bloedbestanddeelen, te blijven gebruiken, daar wel gebleken was, dat het bloed op zichzelf reeds veel bijdroeg tot de electieve werking, waarover velen tevreden zijn. En het is dan ook vooral het bezwaar der niet onmiddellijke bruikbaarheid, dat de prikkel is geweest tot het aanbrengen van verbeteringen.

PILON, gebruik makende van de proeven van DEELEMAN, die vond, dat de choleravibrionen 2—5 × meer soda verdragen dan typhus en coli, en nadat uit eigen proefnemingen gebleken was dat het CO_2 grooten invloed had op het rijpings-

proces en de bevordering der onmiddellijke bruikbaarheid van het bloed-alkali-mengsel, stelde een voedingsbodem samen uit varkensbloed, dat het meest electief zou werken, en een 12 % sodaoplossing, welke, in gelijke hoeveelheid bij elkaar gevoegd een mengsel geven, dat, met 4 % voedingsagar in de verhouding 3 : 7 agar, een plaat geeft, welke aanstonds bruikbaar is. Deze voedingsbodem is eveneens electief; het nadeel is, dat het bloedsodamengsel sterilisatie slecht verdraagt, spoedig klonterig wordt en dus voor gebruik ongeschikt, wat bij het DIEUDONNÉ-mengsel niet het geval is. Volgens PILON groeien op zijn kweekmedium de cholera-vibrionen goed en werden de overige microben vrijwel evenveel geremd als op de DIEUDONNÉ-plaat.

PILON had geen echte cholera-faeces tot zijn beschikking; en dat dit verschil geeft met zijn eigen uitkomsten hebben de proeven van KABESHIMA bewezen.

HOFER en HOVORKA bevestigen de mededeeling van LAUBENHEIMER, dat vorm en groei der cholera-vibrionen op de DIEUDONNÉ-plaat worden gewijzigd en zijn geneigd ook de vermindering in agglutinabiliteit der vibrionen toe te geven. Zij vonden in de Balkanoorlogen dien voedingsbodem niet electief: B. pyocyaneus, B. proteus, B. faecalis alcaligenes, mesentericusvormen, cocci groeiden er op. Daarom wijzigden zij de verhoudingen van den oorspronkelijken DIEUDONNÉ-agar en namen 1 deel bloed op 4 deelen alkali, en vonden dit mengsel geschikt voor het bereiden van electieve platen. Bij toevoegen

van 5 c.c. 1 % crystalviolet-oplossing op 10 c.c. van hun gemodificeerden DIEUDONNÉ-agar leken alle niet-choleravibrionen nog meer geremd.

Terwijl de boven aangehaalde onderzoekers het bloed in toto hebben gebezigd, gebruikten anderen alleen het haemoglobine. Dit is van voordeel voor een mobiel laboratorium, daar dit bloedbestanddeel gemakkelijk en chemisch zuiver mede te nemen is, aanstonds bruikbaar plaatmateriaal verschaft en steeds ter beschikking blijft voor onmiddellijke bereiding. Ook hier moet HEIM als eerste genoemd worden; hij voegde bij 10 gram haemoglobine 90 c.c. aqua destillata en 10 c.c. ± 10 % kaliloog-oplossing; dit mengsel werd gesteriliseerd en kon bewaard worden. Ter bereiding van een voedingsbodem voegde hij bij 1 c.c. 7 c.c. agar; behalve pneumokokken, typhus- en FRIEDLÄNDER-bacillen groeiden ook vibrionen er goed op.

ESCH vond dat in het bijzonder de B. pyocyaneus een lastige mededinger is op de DIEUDONNÉ plaat. Voor een goeden choleravoedingsbodem nam hij nu als criterium een onmiddellijke bruikbaarheid, en bevredigende uitkomsten bij enting met een met B. pyocyaneus besmette kunstmatige cholerafaeces. Bij gebruik van haemoglobine uit paardebloed (in poeder- of bladvorm, van MERCK) kreeg hij bij de volgende bereidingswijze als eindresultaat van zijn proeven: 5 gram haemoglobine worden opgelost in 15 c.c. normaal natronloog en 15 c.c. aqua destillata; deze oplossing wordt een uur gesteriliseerd, en hiervan geven 15 c.c. met 85 c.c. neutralen agar

genoeg materiaal voor 7 platen, aanstonds bruikbaar na stolling (± 1 uur). ESCH zegt, dat de cholera-vibrionen in goede kolonie's groeien, maar dat de DIEUDONNÉ-plaat meer electief is, waarmee een groot voordeel verloren is gegaan voor zijn overigens onmiddellijk bruikbaren en eenvoudig te bereiden voedingsbodem.

Ten slotte heeft KABESHIMA eenige jaren geleden een methode aan de hand gedaan, waarbij hij uitging van een haemoglobine-extract en een sodaopl. 't Recept is: breng 80 c.c. gesmolten 3 % voedingsagar in een Erlemeyerkolf en voeg 10 c.c. 18 % sodaoplossing toe, en kook dit samen 10 minuten. Laat het daarna op 50° C. afkoelen en voeg nu bij 3 gram haemoglobine-extract PFEIFFER, dat in 10 c.c. 0.85 % keukenzoutoplossing is opgelost. Giet dit mengsel na goed dooreenmengen dadelijk in 7 Petrischalen en laat ze openstaan, tot de agar vast is. Om het kondensatiewater te laten verdampen, is het aan te bevelen, de platen omgekeerd gedurende 20—30 min. in de broedstoof te plaatsen. Men krijgt een doorzichtigen en donkerbruinen voedingsbodem.

KABESHIMA heeft zijn eigen platen vergeleken met die van DIEUDONNÉ, PILON en ESCH; hij gebruikte reinculturen, kunstmatige en echte cholerafaeces.

De voedingsbodem van ESCH remde alleen de B. dysenteriae SHIGA KRUSE, overigens groeiden B. coli, B. pyocyaneus, B. faecalis alcaligenes, B. proteus, B. typhi, en kokken er allen op.

Ofschoon de voedingsbodem van PILON met kunstmatige cholerafaeces goede resultaten gaf, viel hij

in de praktijk tegen; de groei der cholera-vibrionen was zeer langzaam, zoodat KABESHIMA in de cholera-epidemie dezen voedingsbodem weldra niet meer gebruikte, ofschoon de resultaten wel verschillend uitvielen.

De DIEUDONNÉ-agar gaf goede resultaten, maar de kolonie's waren vrij klein; na een vooraf staan gedurende 18 uur in de broedstoof, wat noodzakelijk was voor een goed resultaat, verkreeg hij na 18 uur broeden dunne schijfjes van 0.8—1.5 mM.; in 78 % waren de kolonie's reinculturen.

Wat zijn eigen platen betreft, deze gaven in 93.7 % reinculturen, maar bovendien bleken de kolonie's na 18 uur tot 2—2.5 mM. groote, halve bolletjes te zijn uitgegroeid, zoodat hij in vele gevallen onmiddellijk een oriënteerende agglutinatieproef kon instellen. De electiviteit was even goed als van de DIEUDONNÉ-plaat.

BAERTHLEIN en GILDEMEISTER, die de voedingsbodems van PILON, DIEUDONNÉ, KABESHIMA en HOFER-HOVORKA met elkander vergeleken, vonden de laatste onvoldoende door veel te sterke remming van den groei. Ofschoon het kweekmedium van PILON over het algemeen voldeed, groeiden de choleravibrionen er soms niet op; het was overigens even electief als de voedingsbodem van DIEUDONNÉ. Deze liet af en toe de B. faecalis alcaligenes te vrij groeien. Over den voedingsbodem van KABESHIMA waren zij zeer tevreden, de B. faecalis alcaligenes werd meer geremd en de groei van den V. cholerae bleek zeer goed te zijn; een nadeel was, dat de voedingsbodem

niet duurzaam was, omdat het haemoglobine extract niet goed kan worden gesteriliseerd. De schrijvers geven nu een wijziging in de bereiding aan, waardoor B. faecalis alcaligenes evenwel weer minder geremd wordt.

Ook v. LINGELSTEIN vond de PILON-plaat even goed bij versche bereiding als die van DIEUDONNÉ. De voedingsbodems van ESCH en KABESHIMA remden de andere microben niet zoo goed als die van DIEUDONNÉ en Pilon.

Gaat men dus na, wat verschillende onderzoekers oordeelen over de verschillende kweekmedia met bloed- of haemoglobine-bestanddeelen, dan blijkt de voedingsbodem van KABESHIMA wel de beste der DIEUDONNÉ-vervangers te zijn; deze laatste heeft de bewaarbaarheid voor. GHEDINI is van meening, dat de DIEUDONNÉ-plaat niet kan opgegeven worden voor nieuwere soorten electieve media; hij beveelt door middel van titratie aan de alkalescentie van het bloedloog mengsel te bepalen en dit op peil te houden door er zoo noodig alkali bij te voegen.

* * *

Wat de verklaringen betreft van het wezen der electieve werking, geeft DIEUDONNÉ in zijn oorspronkelijke publicatie als zijn meening weer, dat èn het bloed èn het alkali-gehalte te zamen de gewenschte electiviteit geven. Giet men namelijk agar-platen van even hooge alcalescentie, maar zonder bloed, dan ziet men naast den V. cholerae ook B. coli opkomen. Men moet zorg dragen voor een goede

uitdamping van het ammoniak; dit belet den choleragroei, vandaar dat het noodzakelijk is de platen eerst na 24 uur te gebruiken.

PILON denkt dat niet zoozeer het ontsnappende ammoniak een groote rol speelt, maar dat de overblijvende vrije loog met het koolzuur uit de lucht een carbonaat moet vormen, wat eerst na 24 uur zoover gevorderd is, dat choleravibrionen er op groeien kunnen. Bij verdere inwerking van de lucht gaat de electiviteit verloren; dit gaf VAN LOGHEM aanleiding het bloed-alkalimengsel met een laag paraffinum liquidum te bedekken. PILON vond, dat ook na langdurig koken van het bloedalkaliagarmengsel de electieve werking langzamerhand minder wordt. Terwijl vrijwel alle onderzoekers evenals DIEUDONNÉ meenen, dat het ammoniak den groei der cho eravibrionen schaadt, onderschrijven NEUFELD und WOITHE dit oordeel niet. De plaat mag na het gieten niet gesloten worden; er moet een uitwisseling van gassen plaats hebben; meer nauwkeurige feiten kunnen zij hierover niet vermelden; zij vermoeden evenwel dat daarbij een vermindering van de alcalescentie aan de oppervlakte plaats vindt, die misschien gedeeltelijk door verdamping van het ammoniak geschiedt; het ammoniak is opzichzelf, voor den V. cholerae onschadelijk.

De bezwaren, die men bij het gebruik van den voedingsbodem van DIEUDONNÉ ondervonden heeft, zijn voor mij een aanleiding geweest de reeds bekende factoren, die bij de electieve werking de hoofdrol spelen, nog eens na te gaan, te onder-

zoeken welke plaats de loog en het bloed daarin innemen, en den invloed van een reeds herhaaldelijk aangeduiden factor, die tot nu toe, voor zoover mij bekend, nog niet onderzocht is, het ammoniak, nader te leeren kennen.

HOOFDSTUK III.

Vergelijkende proeven over de veranderingen der alcalescentie, de electiviteit en de onmiddellijke bruikbaarheid.

---

§ I. Inleiding.

Voor de alcalescentie-bepaling gebruikte ik het phenolphthaleïne, en wel een 1 % alcoholische oplossing. Wanneer bij 1 c.c. bloedalkalimengsel 100 c.c. aqua destillata worden gevoegd en 5 c.c. $^1/_{10}$ N. zoutzuur oplossing, blijken 10 druppels phenolphthaleïne den besten kleuromslag te geven bij de terugtitratie.

Clark en Lubs hebben in het Journal of Bacteriology uiteengezet, wat er geschiedt bij de kleurverandering die wij met ons oog waarnemen. In een zuur of basisch medium is een dissociatie in ionen, welke samen een constante vormen. Terwijl vroeger gemeend werd dat indicatoren in ongedissocieerden toestand als zuur of base een andere kleur hebben, dan in gedissocieerden toestand, bleek later dat een kleurverandering optreedt door de vorming van een geheel nieuwe stof, die in het algemeen een tautomeer is van de oude. De graad van dissociatie nu bepaalt welke tautomeer zal

optreden of op den voorgrond treden; de graad van dissociatie bepaalt de vorming dezer tantomeren.

Eerst bij een zekeren graad van dissociatie neemt men den kleuromslag waar; het gaat er om met het oog de verschillen in kleur goed waar te nemen. Bij hoogere dissociatie en reeds sterker aanwezige kleur zijn de verschillen ook weer niet goed te zien.

Deze factoren beperken de grenzen van bruikbaarheid; men moet zich oefenen in het vaststellen van dezen graad van dissociatie, door het aflezen van den kleuromslag.

Nog moeilijker wordt het wanneer het medium waarin men dezen omslag moet beoordeelen een eigen kleur bezit, dan zijn de eerste bepalingen eerst recht moeilijk en moet men verschillende titraties uitvoeren en het gemiddelde der gevonden uitkomsten nemen; later is het gemakkelijker, men is aan de eigen kleur goed gewend, heeft deze scherp voor oogen en onderscheidt nu fijner een verandering.

Dit zijn bezwaren bij de bepaling der alcalescentie; door oefening en door steeds toepassen der zelfde methode wordt zij betrouwbaarder, men kan nu zonder grove fouten te maken ten opzichte van elkaar vergelijken. Op bovengenoemde wijze werd steeds de alkali-bepaling uitgevoerd; een enkele maal bleek meer zuur noodig te zijn om een reactieomslag te verkrijgen waarop kon worden teruggetitreerd.

Men heeft in het bekerglaasje een lichtbruine vloeistof, waarin men vrij scherp den rooden kleur-

omslag kan waarnemen bij het bereiken van het neutraalpunt. In den regel is de vloeistof bij het begin der titratie helder, bij voortgezet toedruppelen van $^1/_{10}$ N. loogoplossing komt er plotseling een neerslag dat vóór het bereiken van het neutraalpunt in de meeste gevallen weer oplost, zoodat de kleuromslag in een heldere vloeistof moet beoordeeld worden.

Daar deze een eigen kleur heeft (lichtbruin), was er in het begin eenige oefening voor noodig het tijdstip der roodkleuring scherp te bepalen, maar deze ervaring wordt spoedig verkregen. De fout die in de eerste bepalingen kon gemaakt worden, werd zooveel mogelijk geëlimineerd door 3—4 bepalingen van eenzelfde mengsel achter elkaar te doen, en daarvan het gemiddelde te nemen; het ging daarbij steeds om slechts enkele druppels, d. i. $^1/_{10}$ òf $^2/_{10}$ cc. $^1/_{10}$ N. loogoplossing. Terwijl ik eerst 6 druppels der 1 % alcoholische phenolphthaleïneoplossing toevoegde, bleek spoedig dat 10 druppels een beter bruikbare en ook sterkere kleurverandering gaven. Daarom werd op deze wijze voortgegaan en had ik in deze methode een geschikte alcalescentiebepaling. Het is eveneens van gewicht dat aqua destillata en geen leidingwater wordt gebezigd ter verdunning; de zouten in het leidingwater beïnvloeden de uitkomsten der titratie zelfs vrij aanzienlijk. Natuurlijk moet door flink roeren met een goed gereinigd glazen roerstaafje voor een innige vermenging der stoffen gezorgd worden. Vóór de definitieve rood-kleuring duidelijk voor den

dag treedt, neemt de vloeistof in het bekerglaasje een mahoniehout-bruine tint aan, die in het eene geval minder uitkomt dan in het andere; door nu telkens na toevoegen van een druppel $^1/_{10}$ normaal loogoplossing goed te roeren en het glaasje tegen het daglicht te houden, ziet men plots een roode tint optreden die na toevoeging van nog een druppel sterk in intensiteit toeneemt; de vorige druppel geeft de grens aan. Bij twijfel over de grenswaarde wordt de titratie herhaald.

Het aantal voor den kleuromslag benoodigde kubiekcentimeters der $^1/_{10}$ normaal loogoplossing wordt afgetrokken van de tevoren toegevoegde hoeveelheid $^1/_{10}$ normaal zuuroplossing, welk verschil de alcalescentie aangeeft van 1 cc. van het bloedalkalimengsel.

Op deze wijze bepaalde ik de alcaliwaarde van de in het laboratorium aanwezige DIEUDONNÉ-mengsels, zij waren bijna allen in kolven bewaard onder paraffinum liquidum, en geëtiquetteerd zoodat ik den ouderdom kon nagaan, wat van groot gewicht zou blijken te zijn.

Voor het gieten van een plaat zuigt men met een pipet 6 c.c. bloedalkalimengsel af die in de Petri-schaal moeten worden geschonken, terwijl er zorg voor moet gedragen worden de pipet te voren eerst met filtreerpapier ter dege af te vegen, wil men voorkomen, dat de plaat geheel door paraffinedeeltjes wordt bedekt. Deze zouden de enting kunnen doen mislukken.

Vervolgens worden 14 c.c. kokende 4 % voe-

dingsagar er bij gevoegd, waarna snel gemengd wordt tot een homogeen mengsel; dit geeft bij koud worden een heldere donkerbruine plaat met glad en glanzend oppervlak.

De platen gelukken het beste wanneer zij aan de lucht gedroogd worden, zooveel mogelijk op een stofvrije plaats, waar toch wel luchtwisseling plaats heeft; zelden was het noodig ze nog even in de stoof te plaatsen. Na 2 uur drogen aan de lucht heeft men in den regel een voldoend vaste en droge plaat; de alcalescentie van het bovenste laagje hangt dus af van de alcalescentie van het bloedalkali-agarmengsel, van de inwerking der lucht en van het ontwijken van het ammoniak.

De 4 %-agar wordt in de keuken van het Instituut voor Tropische Hygiëne volgens een vast recept bereid; zij is ten opzichte van phenolphthaleïne zeer zwak zuur, nl. 1 onder het phenolphthaleïnepunt op 10 c.c. agar van ongeveer 60°, d. w. z. dat bij 10 c.c. bouillonagar van 60° C. 1 c.c. $^1/_{10}$ N. loogoplossing moest gevoegd worden voor de neutralisatie. Zij is door mij herhaaldelijk gecontroleerd, waarbij wel zeer geringe wisselingen in zuurgehalte werden gevonden, maar zoo gering, dat deze geen bijzonderen invloed uitoefenen; ik vond steeds wisselingen van $^1/_{10}$ of $^2/_{10}$ op 10 c.c. agar. Platen bereid met verschillende monsters agar gaven allen hetzelfde resultaat.

Wat de stammen betreft, ik gebruikte de cholerastammen 53, 89 en Thomann, verder een Tor-vibrio, de watervibrionen V. aquatilis en V. dunbar, verder

B. coli, B. typhi, B. dysenteriae type Y, B. pyocyaneus, B. faecalis alcaligenes, B. proteus en een staphylococcus-stam.

Voor de enting werd een vrij sterke suspensie in gesteriliseerde zoutsolutie gemaakt, en hieruit met twee platina oogjes een streepcultuur geënt.

Steeds werden dus reinculturen gebezigd.

De keuze van de stammen is van invloed. Oude laboratoriumstammen kunnen verschillende kenmerkende eigenschappen verliezen; zij zijn dan onbruikbaar voor proefnemingen.

Dr. LEOPOLD die zich, voor ik dit onderwerp ter studie overnam, eenigen tijd met dit vraagstuk heeft bezig gehouden en die zoo vriendelijk geweest is mij de resultaten van zijne onderzoekingen ter beschikking te stellen, onderzocht verschillende vibrionenstammen op hunne eigenschappen. Zoo hield hij slechts de stammen chol. 53 en Thomann over die alle kenmerken van eenen echten choleravibrio vertoonden.

In den V. cholerae 89 had ik eenen ouden laboratoriumstam die verschillende karakteristieke eigenschappen verloren had; de kenmerkende eigenschap den V-cholerae een hoogere alcalescentie te kunnen verdragen was geheel verloren gegaan en daarin ging hij gelijk op met B-coli.

Na eenigen tijd verloor ik den V. chol. Thomann, zoodat mij alleen V-cholerae N⁰. 53 overbleef; daar de Thomann-stam zich evenwel zonder uitzondering geheel gelijk gedroeg als V. cholerae 53 zal dit verlies op het resultaat der proeven wel van geen

invloed geweest zijn. Later gebruikte ik nog V. cholerae A.

In de volgende bladzijden breng ik allereerst te samen de resultaten van proefnemingen over het verband tusschen alcalescentie en electiviteit; ik ging daarbij na in hoeverre de verschillende factoren die de alcalescentie wijzigen, ook van invloed zijn op de electiviteit.

§ 2. Verschillende hoeveelheden alkali en electiviteit.

Door Dieudonné is aangegeven dat een mengsel van gelijke deelen gedefibrineerd bloed en een normaal kaliloogoplossing de beste resultaten geeft; ook hij beproefde dus reeds andere verhoudingen der beide componenten vóór hij het mengsel vond dat hem in staat stelde een goede electieve plaat te gieten. Onder zekere grens kwam dus blijkbaar B. coli ook op. Zou deze eenigermate scherp aanwezig zijn?

Om de alcali-grens te bepalen waarbij B. coli begon te groeien, gebruikte Dr. Leopold een Dieudonné-mengsel van ongeveer $2^1/_2$ maand oud en voegde bij 18 c.c. hiervan opklimmende hoeveelheden eener normaal zoutzuuroplossing toe; hij zag nu op een plaat, bereid van een mengsel waarbij 1.1 c.c. zuur was toegevoegd, de B. coli nog eenigszins opkomen, terwijl na toevoeging van 0.9 c.c. zuur de coligroei nog geheel werd tegengehouden. Dit was dus de grens van electiviteit. De alcalescentie van het

bloedmengsel was bekend, eveneens de hoeveelheid toegevoegd zuur, dus ook de alcaliwaarde van het bloedmengsel dat deze grens van electiviteit gaf.

Hieronder volgt zijn protocol:

TABEL I.

	A	B	C	D
B coli	+	±	−	−
V. chol. Thomann. . . .	+	+	+	+
V. Gatterman[1])	±	−	−	−
V. Aquatilis	+	+	+	−
V. El Tor	+	+	+	−
V. chol. n°. 53	+	+	+	+

A = 42 agar 4 % + 18 bloedmengsel (19/2 '18) + 1.3 c.c. Norm. HCl
B = „ + „ + 1.1 „
C = „ + „ + 0.9 „
D = „ + „ + 0.7 „

De alcalescentie van 't bloedmengsel is 2.4

De alcalescentie van het mengsel C is dus 1.9, dit is de grenswaarde voor den coligroei.

LEOPOLD ging nu van de onderstelling uit, dat, indien de alcalescentie de eenige voorwaarde vormde voor een electieve plaat, alle mengsels die door toevoeging van zuur, resp. alcali, op bovengenoemde grenswaarde worden gebracht, een goede plaat moeten opleveren. Bij zijn proeven hierover is dat niet gelukt, hij slaagde daarin niet, en vond dat toevoeging van zuur aan mengsels van hoogere

[1]) Een organisme, aanvankelijk op gezag der firma KRÀL voor een cholera vibrio gehouden, doch bij later onderzoek niet meer gehandhaafd.

alcaliciteit over het algemeen betere resultaten afwierp dan omgekeerd.

LEOPOLD zegt in zijn verslag dan ook zelf: „'t is opvallend dat voor het brengen van de bloedmengsels op dezelfde alcaliciteit, het voor de electiviteit niet onverschillig is of dit geschiedt door zuurtoevoeging bij sterk alcalische mengsels of alcali toevoeging bij zwak alcalische mengsels".

Bij het doorwerken van zijn arbeid viel het mij op dat deze sterk alcalische bloedmengsels de meer versch bereide kolven vertegenwoordigden; de zwak alcalische de andere.

Op mijn beurt trachtte ik een grens te vinden op andere wijze; ik bereidde 7 mengsels met afdalende alcali-waarde:

I	100 c.c. bloed	+ 100 c.c.	normaal kaliloog-oplossing (5.61 %)			
II	„	+ 150	„			
III	„	+ 120	„			
IV	„	+ 100	„			
V	„	+ 90	„	+ 10 c.c.	aq. dest.	
VI	„	+ 80	„	+ 20	„	
VII	„	+ 70	„	+ 30	„	

De mengsels I en IV waren dus gewone DIEUDONNÉ-mengsels; met I beproefde ik reeds de vermindering in alcalescentie tijdens het steriliseeren en ging tot één uur, waarbij ik vond dat na $^1/_2$ uur steriliseeren bij 100° geen verdere daling in alcalescentie plaats had; later bleek dat ik niet ver genoeg gegaan was.

Van deze mengsels werden elk twee platen gegoten, één na 2 uur geënt, de andere na 24 uur.

Regelmatig werden van nu af agar platen gegoten, tevens de alcalescentie bepaald en zoo kon dus worden gevonden bij welken alcali-graad de electiviteit ophield te bestaan; en door de verschillende andere voorhanden mengsels eveneens te beproeven en te titreeren kon worden nagegaan of er een alcali-drempelwaarde bestond, beneden welke de electiviteit verloren ging. Bestond deze dan zou in de praktijk door toevoegen van loog de electiviteit gemakkelijk kunnen worden hersteld; zoo niet, dan moest naast de alcalescentie nog een andere factor zijn.

De mengsels werden met het oog op latere onderzoekingen onder paraffine bewaard, de kolf met een watteprop afgesloten.

TABEL II.

Versch mengsel, geënt na 2 uur open staan aan de lucht.	B coli	V. chol. Thomann	V. aquatilis	V. El Tor	V. chol. nº. 53
I	—	—	—	—	+
II.	—	—	—	—	—
III	—	—	—	—	—
IV	—	—	—	—	+
V	—	+ zwak	—	—	+
VI	—	+	+	—	+
VII	+	+	+	+	+

De platen geënt na 24 uur gaven 't volgende resultaat:

TABEL III.

	B coli	V. chol. Thomann	V. aquatilis	V. El Tor	V. chol. n°. 53
I	—	+	+	—	+
II	—	+	—	—	+
III	—	+	+ zwak	—	+
IV	—	+	+	—	+
V	—	+	+	+	+
VI	+	+	+	+	+
VII	+	+	+	+	+

Het mengsel VII liet dus B. coli groeien na 2 uur open staan aan de lucht; de alcalescentie bleek 1.4 te zijn; mengsel VI liet de groei na 24 uur toe en had een alcaliwaarde van 1.9.

De bloedalkalimengsels werden regelmatig beproefd en getitreerd en zoodra een mengsel dat B. coli niet liet groeien zijne electiviteit tegenover dit micro-organisme verloren had, kon de alcalescentie vergeleken worden met die van het versche VII-mengsel.

Zoo bleek V na 3 maanden de coligroei toe te laten, de alcaliwaarde was toen 1.5 wat dus goed overeenkwam met bovengenoemde grens.

TABEL IV.

Mengsels 3 maanden oud; 2 uur aan de lucht gedroogd.	V. chol. nº. 53	V. aquatilis.	B coli	staphylococcus	alcalescentie:
I	+ dik	zwak +	—	+	1.9
II	—	—	—	—	3.2
III	+	—	—	—	2.7
IV	+ dik	±	—	±	2.
V	+ dik	+	+ dun	+	1.5
VI	+ dik	+	+	+	1.4
VII	+ dik	+	+	+	1.2

Meenende hiermede de drempelwaarde gevonden te hebben, heb ik een aantal oude, niet meer electieve bloedalkalimengsels getitreerd.

Het resultaat kwam in het geheel niet overeen met de gevonden drempelwaarde; verwacht mocht immers worden, dat al die mengsels welke niet electief waren, ten hoogste een alcaliwaarde zouden bezitten van ± 1.5.

Het volgende protocol doet zien hoe het met de alcalescentie dier oude mengsels gesteld was.

Verscheidene hebben een hooger looggehalte dan het versche VII-mengsel, al zijn zij niet electief. Bovendien kan men uit deze en de vorige protocol nog iets anders aflezen, n.l. dat mengsels van even hooge alcalescentie toch zeer in electieve eigenschappen met elkaar verschillen. Dit is nl. het geval met mengsel III, dat drie maanden oud was, en met de DIEUDONNÉ kolf van 24-4-'18; de alcaliwaarde der eerste is 2.7, der laatste 2.6. Terwijl III de coli-, aquatilis- en staphylokokkengroei geheel remt,

komen zij op het andere bloedalkalimengsel allen op. 't Is dus wel duidelijk, dat de alcalescentie alleen niet de factor is die de electiviteit bepaalt.

TABEL V.

DIEUDONNÉ mengsel van:	B. typhi	B. coli	staphylo coccus	B. pyocy-aneus	V. aqua-tilis	B. dys. Y.	V. chol. 53	V. chol. 89	alcalescen-tie in 1/10 N. loog
24-4-'18	+	+	+	+	+	—	+	+	2.6
23-3-'17	+	+	+	+	+	+z.zw.	+	+	1.1
29-1-'18	+	+	+	+	+	—	+	+	2.5
19-2-'18	+	+	+	+	+	—	+	+zw.	2.3
16-2-'18	+	+zw.	+	+	+	—	+	+zw.	3.
23-3-17 Z.	+	+	+	+	+	—	+	+	1.
14-5-'18	+	+	+	+	+	—	+	+zw.	3.
18-5-'17	+	+	+	+	+	+z.zw.	+	+	1.2
D.	+	+	+	+	+	—	+	+	2.5

De platen zijn alle 2 uur aan de lucht gedroogd. (5 Sept. 1918).

§ 3. STERILISEEREN, ALCALESCENTIE EN ELECTIVITEIT.

Een DIEUDONNÉ-mengsel heeft vóór het steriliseeren een zeer hoog looggehalte, en dieproode „lak" kleur. Giet men van deze vloeistof platen volgens het gewone recept, dan zijn zij niet fraai glanzend en doorschijnend, maar doffer.

Op een vorige bladzijde vermeldde ik reeds een eerste poging om den teruggang in alcalescentie na te gaan tijdens het steriliseeren, en contrôleerde dit een uur lang, van kwartier tot kwartier een proef uit de kolf nemende voor de titratie. Na een

half uur en een uur vond ik dezelfde waarden.

Later zette ik het sterilisatieproces langer voort, tot 7 uur toe, en vond een geleidelijke daling. Was de alcaligraad voor het plaatsen in den pot van PAPPIN 4.9 c.c. $^1/_{10}$ N. loog per c.c. DIEUDONNÉ-mengsel, deze waarde werd achtereenvolgens na

15	min.	: 4.3
30	„	: 3.8
1	uur	: 3.8
$2^1/_2$	„	: 3.2
5	„	: 2.5
7	„	: 2.3

Bij eenzelfde onderzoek van een ander, nieuw gemaakt, bloedmengsel, waren deze getallen resp. tot en met 5 uur steriliseeren:

	vóór	sterilisatie	: 3.8
na 15	min.	„	: 3.2
30	„	„	: 3.1
1	uur	„	: 3.1
$2^1/_2$	„	„	: 2.5
5	„	„	: 2.4

De alcalescentie der beide *versche* DIEUDONNÉ-mengsels verschilde dus niet onbelangrijk; toch waren beide zooals te verwachten was goed electief, daar deze getallen verre boven de grenswaarde der electiviteit der mengsels afzonderlijk liggen. (Zie tabel II.)

Na dit sterilisatieproces blijft de alcali waarde den eersten tijd op dezelfde hoogte; toch ziet men

na enting verschillende resultaten, al naar gelang men het mengsel onmiddellijk na steriliseeren bezigt voor het gieten van een plaat, of eenige dagen er mee wacht.

Dit leerde mij de volgende proef: ik bereidde een 3-tal DIEUDONNÉ-mengsels en eveneens drie kolven van de samenstelling als van mengsel V (tabel II) en onmiddellijk na de sterilisatie werden van elk twee platen gegoten; de eerste serie werd na $1^1/_4$ uur, de tweede groep na 2 uur geënt met B. coli, staphylokokken, B. pyocyaneus, B. dysenteriae Y, V. El Tor IV, V. aquatilis, B. typhi en V. cholerae 89 en 53 [1]).

De platen, dadelijk na de bereiding van de bloed-alkali gegoten, gaven alle een negatief resultaat; de stammen waren ter contrôle op gewone voedingsagar overgeënt en bleken op deze goed op te komen.

Den volgenden dag, toen de mengsels 24 uur oud waren, werd dezelfde proef herhaald met dit verschil dat de platen nu resp. 2 en 4 uur aan de lucht werden gedroogd. Nu groeide V. chol. 53 zwak op de eerste serie platen, en beter op die welke 4 uur gedroogd waren, op de platen gegoten van mengsel V. De gewone DIEUDONNÉ-platen gaven na 2 uur een negatief resultaat, na 4 uur een zwakke groei.

Laat men de platen 24 uur aan de lucht staan, dan zijn de uitkomsten zeer bevredigend. Er heeft

[1]) De V. chol. 89 was een oude cholera stam, die slechts op een DIEUDONNÉ plaat, gegoten van oude mengsels, groeide, en dan nog vaak wisselend.

dus een soort „rijping" plaats, waardoor de bloedalkali voedingsbodem spoedig, na een paar dagen reeds, voor het gebruik beter geschikt wordt gemaakt.

§ 4. Bewaren, alcalescentie en electiviteit.

Tijdens het bewaren van een Dieudonné-mengsel, hetzij met, hetzij zonder bedekking door paraffinum liquidum, gaat de alcalescentie geleidelijk achteruit, en op een zeker oogenblik is ook de electiviteit verloren gegaan. Dan komen andere micro organismen naast den V. cholerae op, ofschoon eerst zwakker dan deze laatste, zoodat de plaat nog wel bruikbaar is.

De mengsels die ik in Juni 1918 bereidde en onder paraffine bewaarde, behielden hunne volstrekte electiviteit gedurende 3 maanden; toen kwam de watervibrio zwakjes op, B. coli werd evenwel nog tegengehouden; Tabel IV geeft deze uitslag weer.

In September maakte ik opnieuw eenige kolven, waarvan er sommigen zonder paraffine werden bewaard, en ging geregeld de electiviteit na. Nu vond ik na ruim 3 maanden nog een volstrekte electiviteit bij het mengsel dat onder paraffine bewaard was, terwijl de platen, gegoten van het bloedalkalimengsel dat niet door een laag paraffine was bedekt, de groei toeliet van staphylokokken en B. pyocyaneus; de colibac., watervibrionen, typhus- en proteus-bacillen werden nog tegengehouden.

Het verlies van electiviteit verkeerde dus in een begin stadium, maar was toch duidelijk aanwezig.

TABEL VI.

17 December 1918	V. chol. 53	V. chol. 89	B. coli	V. aquatilis	B typhi	staphylococcus	B. proteus	B. pyocyaneus	B. faecalis alcaligenes
Dp	+	—	—	—	—	—	—	—	—
D	+	+zw.	—	—	—	+	—	+	—

Dp = DIEUDONNÉ-mengsel onder paraffine bewaard.
D = „ „ zonder paraffine-bedekking.

Ik kan dus de meening van VAN LOGHEM en NIEUWENHUYSE, die zeggen dat de bruikbaarheid van het DIEUDONNÉ-mengsel door het door hen aangegeven hulpmiddel verlengd wordt, onderschrijven, maar vond de electiviteit niet zoo lang intact als zij konden constateeren. De alcalescentie zag ik geleidelijk afnemen, en doordat ik deze van elk nieuw bereid mengsel bepaalde, bleek mij dat de alcalescentie na de bereiding zeer kan wisselen, de getallen op blz. 35 laten dit zeer duidelijk zien.

Ik vond waarden varieerend tusschen 2.5 en 3.8, terwijl het alle zeer electieve mengsels waren.

De oorzaak kan niet gelegen zijn in de normaaloplossing van kali-loog, deze is natuurlijk constant en werd telkenmale versch bereid.

Het moet dus zijn grond hebben in het bloed.

Ik bepaalde nu de alcalescentie van alle aanwezige bloedmengsels die in het laboratorium voorhanden waren, vrijwel alle onder paraffine bewaard

van verschillenden ouderdom, en vond, evenals LEOPOLD bij zijn onderzoekingen, de waarden zeer uiteenloopend, van 1 tot 3. Deze oude mengsels gaven geen van alle meer een electieve plaat, terwijl een alcaligraad van 3 toch een zeer vol doende looggehalte vertegenwoordigt. (Zie tabel V.)

't IV-mengsel (10 Juni), dat een gewoon DIEUDONNÉ-mengsel was, had na één maand een alcalescentie van 2, 3; deze zelfde alcaliwaarde had ook het DIEUDONNÉ-mengsel van 19/2-1918, dat toen 7 maanden oud was; beiden waren onder paraffine bewaard.

De electiviteit dezer beide mengsels was echter geheel verschillend; terwijl het jongere mengsel de coli groei geheel remde en den watervibrio slechts zwakjes liet groeien, kwamen zij op de oude DIEUDONNÉ-platen goed op.

Het uiteenloopende looggehalte der mengsels is te begrijpen wanneer men reeds bij versch bereide DIEUDONNÉ-mengsels een vrij sterke wisseling vindt bij titratie, zooals ik kon vaststellen. Een mengsel van lager alkaligehalte, maar tamelijk jong kan zeer electief werken, en bij een oud mengsel met hoogere alcalescentie kan zij verloren zijn gegaan. De ouderdom blijkt een voorname factor te zijn, wat uit het zooeven gegeven voorbeeld ook duidelijk spreekt. Zoo vond ik bij een mengsel van 7 maanden een alcalescentie van 3, terwijl dit bij een kolf van 5 maanden 2,6 was. Beiden zijn hooger geweest, toen zij nog versch waren. LEOPOLD beproefde reeds door loogtoevoeging aan oudere mengsels hun

electiviteit te verhoogen, en kreeg geen goede resultaten; zuurtoevoeging aan mengsels met hoogere alcalescentie werd zelfs beter verdragen. Hij concludeerde dan ook dat er naast de alcalescentie nog een andere factor bestaan moest, want alcalescentie en electiviteit loopen niet parallel.

De vraag rijst dus of de wisselende uitkomsten niet beter begrepen worden, indien wordt aangenomen, dat het bloed op zich zelf reeds de voornaamste factor is voor de electiviteit, terwijl het hierin wordt bijgestaan door een hoog looggehalte. Op deze vraag kom ik in hoofdstuk IV terug.

§ 5. Het doorleiden van gassen.

Het blootstellen van de Dieudonné-plaat aan de lucht bevordert den groei van den V. cholerae, verhoogt evenwel ook de kansen voor het opkomen van B. coli. Terwijl dit aanvankelijk vaak geweten werd aan het ontsnappen van ammoniak, was Pilon van meening dat het koolzuur uit de lucht de vorming van carbonaten in de hand werkt. Hij stelde platen bloot aan de inwerking van dit gas in een koolzuuratmosfeer; dit principe was de grondslag voor de bereiding van zijn bloedmengsel. Ik volgde dezen gedachtengang verder en beproefde de verandering in alcalescentie en electiviteit na doorleiding van gassen: lucht, koolzuur en stikstof.

Er werden 4 Dieudonné-kolven gemaakt, één er van diende ter contrôle. Den volgenden dag werd door één kolf gewone lucht geleid. Door middel

van een waterzuigpompje werd de lucht uit de kolf weggezogen, terwijl versche lucht uit een glazen buis, die door een geperforeerde kurk stak en tot op den bodem der kolf reikte, het bloedalkalimengsel doorborrelde. Dit geschiedde 2 uur lang; de inhoud van een kolf was 100 c.c. De inhoud van een tweede kolf werd op dezelfde wijze met koolzuur behandeld, eveneens gedurende twee uren.

De derde kolf diende voor doorleiding met stikstof. Deze werd op de volgende wijze zuiver verkregen.

Men mengt één volume eener 22 % pyrogallooplossing met een 5—6 voudige hoeveelheid geconcentreerde kaliloogoplossing (3 : 2). Eén c.c. dezer oplossing absorbeert 12 c.c. zuurstof. De absorptie geschiedt het beste bij 15° C. De in 100 c.c. lucht aanwezige zuurstof wordt in 3 minuten zeker geabsorbeerd. Een pyrogallooplossing van bovengenoemde concentratie ontwikkelt geen koolmonoxyde. En ook koolzuur wordt geabsorbeerd.

Er werden dus eenige voor deze proef geschikte kolfjes gevuld met de pyrogallooplossing, aan het eind der reeks stond het Dieudonné-mengsel. Van deze laatste werd de lucht door een waterzuigpomp weggezogen; vóór dat de aangezogen lucht het bloedalkalimengsel doorborrelde moesten de drie fleschjes met pyrogallooplossing gepasseerd worden, en de lucht werd op haar weg beroofd van het koolzuur en de zuurstof. Praktisch werd dus stikstof, een indifferent gas, doorgeleid.

De alcalescentie van het Dieudonné-mengsel waar

lucht en stikstof doorheen geleid was bleef dezelfde; het mengsel dat met koolzuur doorborreld was had zijn alcalescentie verloren, was neutraal geworden.

Wat de electiviteit betreft, deze is gemakkelijk af te lezen uit het volgende protocol:

TABEL VII.

	V. chol. 53.	V. aquatilis	B. coli	staphylococcus
DIEUDONNÉ mengsel niet doorgeleid	+	—	—	—
„ „ doorgeleid met lucht	+	—	—	—
„ „ „ „ stikstof	+	—	—	—
„ „ „ „ koolzuur	+ dik	+	+	+

Het met koolzuur behandelde mengsel had zijne electiviteit dus geheel en al verloren, en was van neutrale reactie. De overigen waren gelijk gebleven.

Toen ik een tweetal maanden later dit koolzuurmengsel weer eens beproefde op zijn electiviteit, wachtte mij eene verrassing: nl. B. coli kwam niet op, en de staphylokokken zwakjes. 't Mengsel had zich dus „hersteld" van de gewelddadige doorborreling met koolzuur. Bij titratie bleek de alcalescentie zeer gering te zijn: 0.6.

Vergelijkt men hiermede een mengsel dat toen 11 maanden oud was en B. coli en staphylokokken goed liet groeien, en een 3 × hoogere alcalescentie bezat nl. 1.7, dan demonstreert dit wel zeer duidelijk dat de alcalescentie niet den doorslag geeft voor de electieve eigenschap van het DIEUDONNÉ-mengsel.

§ 6. Dunne en dikke plaat vergeleken.

In de litteratuur vindt men soms aangegeven de platen niet dik te maken, maar ze dun uit te gieten. Dit zou de uitdamping bevorderen van het voor den choleragroei zoo-schadelijke ammoniak.

Om dit na te gaan bereidde ik naast gewone platen, d.i. 20 c.c. bloed-alcali-agar-mengsel in een Petrischaal van ± 10 c.M. diameter, ook zeer dikke platen. Voor de bereiding van deze laatsten bezigde ik bekerglaasjes van 5 à 6 c.M. diameter en goot deze vol met het plaatmateriaal; zoodoende kreeg ik platen die ongeveer 25 × zoo dik waren als de gewone dunne platen. Een liter bloed-alkalimengsel werd 7 uur lang gesteriliseerd; vóór het begin van het sterilisatieproces en daarop onderscheidenlijk na 15 min.; 30 min.; 1 uur; $2^1/_2$ uur; 5 uur en 7 uur werd er materiaal ontnomen voor het gieten van een dunne en dikke plaat, voor de alcalescentie-bepaling en eveneens voor de overdestillatie van het ammoniak. Over dit laatste later meer.

De platen liet ik 24 uur aan de lucht staan. Bovendien had ik ze in vier quadranten verdeeld, waarvan er drie op achtereenvolgende dagen geënt werden, het vierde kon dienen voor opsmelten ter bepaling der alcalescentie.

Ik kon dus nagaan hoe langen tijd sterilisatie er noodig was om de electiviteit verloren te doen gaan, en na welken tijd blootstellen aan de lucht dit eveneens het geval was. Door het contrôleeren gedurende verscheidene dagen van een vorige enting

kon nagegaan worden het verloop van den bacteriegroei: een negatief-blijven eener enting, een zwak opkomen of blijven op latere dagen, of een dikker worden der streepcultures. Dit kon dus de schadelijke inwerking demonstreeren der verdampende gassen op de micro-organismen. Hoewel de resultaten dezer proeven eerst later uitvoerig worden besproken moet ik ze, in verband met het onderzoek der alcalescentie, hier even aanroeren.

Het bleek dat de dikke platen den bakteriegroei min of meer remden, bij de dunne plaat vergeleken; maar het voornaamste hiervan was evenwel dat B. coli veel meer in zijn groei werd belemmerd dan de choleravibrionen. In een geval waar dit bijzonder duidelijk voor den dag kwam, bepaalde ik de alcalescentie van de dunne en dikke plaat. Bleek het dat deze bij de dikke plaat hooger was, dan lag het voor de hand hieraan het verschil in resultaat en electiviteit te wijten.

Voor de titratie moest de agar worden opgesmolten en verder op geheel dezelfde wijze getitreerd als ik gewoon was te doen; alleen moet er op gelet worden dat in beide gevallen bij dezelfde temperatuur wordt getitreerd bijv. bij 55° C.

Bij de titratie vond ik volkomen dezelfde alcalescentie.

De alcalescentie heeft dus op den uitslag van deze proeven geen invloed gehad.

§ 7. Toevoegen van alkali aan bouillonagar.

Ofschoon reeds in de litteratuur is aangegeven dat bouillonagar en voldoend looggehalte te zamen

geen electieve plaat voor den choleravibrio opleveren, heb ik voor eigen overtuiging een paar proeven hierover ingeschakeld. Ik maakte een alkalische oplossing van $^1/_2$ normaal loog, en voegde bij 20 c.c. 2% bouillonagar 1 tot en met 6 c.c. dezer loogoplossing; geënt werd weder met V. chol. 53 en 89, de watervibrio V. aquatilis en B. coli.

Bij toevoegen van 2 c.c. $^1/_2$ N. loog kwam alleen V. chol. No. 53 op, doch zwak, de overigen waren niet opgekomen; terwijl bij toevoegen van 1 c.c. alles groeide. Een hooger looggehalte, dus 3 tot en met 6 c.c., verdroeg geen van deze vier micro-organismen. De platen hebben twee uur aan de lucht open gestaan.

Een herhaling dezer proef leverde een soortgelijk resultaat; B. coli groeide niet meer bij toevoegen van 2 c.c. $^1/_2$ N. loogopl., ofschoon de V. chol. 89 en V. aquatilis nu uiterst zwak opkwamen. Dergelijke kleine onregelmatigheden komen meer voor, en veranderen niets aan de waarde der proef, want in geen van beide gevallen werd een goede electieve plaat verkregen.

Ik ging hierna over tot bijvoeging van opklimmende hoeveelheden dezer loogoplossing aan een Dieudonné mengsel dat zijne electiviteit verloren had; de contrôleplaat gaf een goede coligroei. Het bloedalkalimengsel had een lage alcalescentie, en was slechts een paar maanden oud. Nu bleek dat toevoegen van 0.2 c.c. $^1/_2$ N. loog voldoende was om den coligroei geheel te remmen; 1 c.c. loogopl. gaf nog steeds een weligen choleragroei. Rekende ik de alcalescentie voor de geheele plaat uit, dan kwam

ik op een veel lager acaliwaarde dan bij boven genoemde bouillon-loog-platen.

Men moet dus aannemen dat de choleravibrio meer in het bijzonder in tegenwoordigheid van bloed veel meer loog kan verdragen dan B. coli niet alleen, maar dat B. coli in tegenwoordigheid van bloed meer de schadelijke werking van het loog ondervindt.

In het bloed zit dus een groote electiviteit-bevorderende kracht, vooral in een mengsel dat nog niet te oud is. Want bij eenzelfde proef met oudere bloedalkalimengsels, waarvan met hoogere alcalescentie, bleek meer loog noodig te zijn om den coligroei te remmen. 't Naderde in zijn eigenschappen dus meer de gewone voedingsagar.

HOOFDSTUK IV.

De invloed van het bloed.

Uit de resultaten der vermelde proeven komt duidelijk de invloed van het bloed aan den dag. Herhaaldelijk kon worden aangetoond dat het looggehalte van de plaat niet de doorslaggevende factor was die de electiviteit beheerschte. De laatste der reeks kolven met dalende alcalescentie, liet, ondanks zijne versche bereiding, op de daarmede gegoten DIEUDONNÉ-plaat den B. coli wel groeien; dit doet den belangrijken invloed van het alcaligehalte kennen. Maar tallooze andere mengsels met voldoende alcalescentie hadden hunne electiviteit ingeboet.

Toevoeging van loog aan bouillon-agar, zelfs vrij veel, gaf geen bevredigend resultaat ofschoon een vrij hoog looggehalte bereikt werd; daarnaast staat het met koolzuur doorgeleide mengsel dat na eenigen tijd bewaren den groei van B. coli remde met zeer lage alcalescentie. Deze twee platen steken dus scherp tegen elkaar af: aan den eenen kant een plaat gegoten van sterker alcalische bouillonagar met positieven coli-groei, aan den anderen kant een DIEUDONNÉ-plaat gegoten van een mengsel van diezelfde bouillonagar en het laag-alcalische bloed-

mengsel, dat dien groei duidelijk tegenhield. Het eenige verschil tusschen deze beide was de aanwezigheid van het bloed.

De ervaring heeft voorts geleerd dat de specifieke bestanddeelen die zulk een grooten invloed op de electieve eigenschappen van de DIEUDONNÉ-plaat hebben, na zekeren tijd te loor gaan, terwijl wij proefondervindelijk hebben vastgesteld dat koolzuur de electiviteit eveneens ondermijnt. Dat deze beide processen van onwerkzaam worden identiek zouden zijn is onwaarschijnlijk: men ziet de electiviteit immers evenzoo bij mengsels onder paraffinum liquidum bewaard, afnemen, zij het na langeren tijd.

Op den invloed van andere chemische omzettingen wijst ook de omstandigheid dat met een DIEUDONNÉ-mengsel dadelijk na de sterilisatie geen plaat is te verkrijgen voor onmiddellijk gebruik, terwijl dit wel het geval is zoo het een mengsel betreft dat slechts weinige dagen oud is, ook al is het aanstonds onder paraffinum liquidum bewaard geworden.

De invloed van het versch bereide mengsel doet zich kennen uit de uitkomsten der platen verkregen van bloedalkalivoedingsbodems van verschillende ouderdom, waarvan de ouderen ondanks „voldoende" alcalescentie geen bruikbare electieve eigenschappen meer bezitten, en dus hunne voor den voedingsbodem van DIEUDONNÉ zoo hooge waarde zijnde electiviteit ten opzichte van den coli-groei, verloren hebben.

Deze invloed van het bloed is op tweëerlei wijze denkbaar.

De bloedbestanddeelen als zoodanig kunnen de kern vormen van den factor die het bloed bij de electiviteit speelt; òf de ontledingsproducten van het bloed bevorderen het tot stand komen van goeden choleragroei en electieve eigenschappen tevens.

Een DIEUDONNÉ-mengsel is immers onmiddellijk na de bereiding niet geschikt voor gebruik, terwijl het na eenige dagen reeds veel betere resultaten geeft. Dit toont aan dat er veranderingen hebben plaats gehad die invloed hebben op den groei der vibrionen.

Wij zien dan hoe bij het ouder worden de choleragroei steeds meer bevorderd wordt, dus steeds meer ongeschikte in geschikte stoffen worden omgezet. In verband met de omstandigheid dat ten slotte andere organismen ook gaan groeien is het het eenvoudigste om aan te nemen dat de aanvankelijke ongeschiktheid bestaat niet in het ontbreken van geschikte stoffen, maar in de aanwezigheid van bakteriegroei belemmerende stoffen.

Aangezien door velen het ammoniak als zoodanig bij het chemisme van de DIEUDONNÉ-plaat wordt opgevat, heb ik aan den invloed van deze verbinding in het bijzonder mijn aandacht gegeven.

HOOFDSTUK V.

Proeven over de beteekenis van het ammoniak.

---

§ 1. Inleiding.

Met betrekking tot de bereiding van de Dieudonné-plaat vindt men door de meeste schrijvers aangegeven dat de plaat vooral 24 uur aan de lucht moet blootgesteld worden. Dit zou verband houden met het ontwijken van het ammoniak, dat schadelijk werkt op alle micro-organismen, en daarom eerst voldoende ontsnappen moet.

Alleen Neufeld und Woithe, die een zeer grondige studie van de techniek bij het gebruik der Dieudonné-plaat hebben gemaakt, zeggen dat dit gas geen kwaad doet.

Bij mijn eigen proeven ben ik begonnen met aan te toonen dat er ammoniak ontweek uit de versch bereide plaat; een vochtig rood lakmoespapiertje werd spoedig blauw. Verder werd nagegaan hoe lang die uitdamping dan wel duurde; nog 3 dagen na het gieten der plaat werd ammoniak aangetoond.

Deze ammoniak-ontwijking heeft ook bij de bloed-

alkalimengsels plaats. Sluit men een kolf met een kurk af, en heeft men een vochtig rood lakmoespapiertje ingeklemd, dan ziet men dit geleidelijk van kleur veranderen. Geen wonder dus dat bij het gieten van een plaat de ontwijking veel sneller plaats heeft: de bijvoeging der kokende agar bevordert het ontsnappen.

De vorming van het ammoniak heeft plaats uit de eiwitten van het bloed. Daar deze zich gedurende het ouder worden langzamerhand ontleden, heeft de ammoniakvorming ook langzaam plaats; een bepaald gedeelte blijft opgelost, al naar gelang de temperatuur en de evenwichtstoestand die zich gevormd heeft, zooals dat geschiedt bij een gas opgelost in een vloeibaar milieu. Bij het gieten van een plaat heeft dus plotseling een versterkte uitdamping plaats.

Een andere factor die de ontwijking begunstigt is een herhaald omschudden van het bloedalkalimengsel: het ammoniak uit de diepere lagen ontsnapt nu ook veel sneller. En het koolzuur uit de lucht kan zijn werking dan des te beter ontvouwen.

Het quantitatief aantoonen van ammoniak geschiedt door overdestillatie en opvangen in een zure vloeistof waarin een indicator aanwezig is; na afloop kan het ongebonden zuur worden teruggetitreerd; men weet dus dat de rest door het ammoniak is gebonden en men heeft nu een maat voor de hoeveelheid ammoniak die aanwezig was.

Om zeker te zijn dat werkelijk àlle ammoniak is

opgevangen moet $^2/_3$ der hoeveelheid vloeistof worden overgedestilleerd.

Nu is deze overdestillatie van het ammoniak uit een bloed-alkalimengsel een minder eenvoudige zaak, want het is als zeker aan te nemen, dat er tijdens de verhitting nieuwe ammoniak wordt gevormd uit de splitsingsproducten der reeds ten deele uiteengevallen eiwitten van het bloed. Dit ammoniak was dus niet aanwezig in de kolf, zou misschien gedeeltelijk ontstaan zijn bij het gieten der plaat door de toevoeging van de kokende agar.

Ik heb dus aan de uitkomsten dezer overdestillatie maar betrekkelijke waarde toegekend, maar meende ze toch te moeten uitvoeren, om verschillende mengsels met elkaar te vergelijken. De fout, nieuwe, oorspronkelijk niet aanwezige ammoniak te doen ontstaan, heb ik getracht zooveel doenlijk te vermijden door de overdestillatie in zoo kort mogelijken tijd te doen plaats hebben; hiervoor is echter een sterkere verhitting noodzakelijk geweest.

De uitvoering geschiedde als volgt: in een Kjeldahlkolf wordt 10 c.c. bloed-alkalimengsel met 50 aq. dest. gedaan; $^2/_3$ hiervan, d.i. dus 40 c.c. wordt overgedestilleerd naar een mengsel van 60 c.c. bestaande uit 25 c.c. $^1/_{10}$ N. zwavelzuur + 35 c.c. aq. dest. + 12 druppels methyl-oranje (indicator). Dit bevindt zich in een flesch van maatstreepjes voorzien, zoodat tot 100 werd overgedestilleerd. De Kjeldahl-kolf is door een spatbol met glazen buis verbonden met een waterkoeler, waar de stoom met het meegevoerde ammoniak wordt gecondenseerd,

en zoo in het zwavelzuur komt. Om het heftige schuimen van het bloedmengsel tegen te gaan, werd dit bedekt met paraffin. liquid. (16—20 druppels), en tevens werd een mespunt puimsteenkorreltjes toegevoegd.

Een goede Bunsen-brander werd, eerst getemperd (de aanwezige lucht doet zeer sterk schuimen), daarna, met volle kracht er onder geplaatst. Zoo was de overdestillatie in ± 25 min. afgeloopen.

Het zwavelzuur $^1/_{10}$ N. werd met een pipet toegevoegd. Na afloop der destillatie worden waterkoeler en buisje uitgespoeld met aq. dest.

Bij de terugtitratie met $^1/_{10}$ N. natronloog wordt de kleur vergeleken met een 100 c.c. aq. dest. waaraan 12 dr. methyl-oranje zijn toegevoegd, om steeds tot een bepaalde gele kleur te vergelijken. Ten slotte wordt de $^1/_{10}$ N. opl. natronloog getitreerd op de $^1/_{10}$ N. zwavelzuur opl. Men weet nu dus nauwkeurig hoeveel ongebonden en dus hoeveel gebonden zwavelzuur er is, en neemt dit laatste als ammoniakwaarde aan.

§ 2. Vergelijking van ammoniakgehalte bij korter of langer steriliseeren en electiviteit.

Bij mijn beginproeven over de waarde van het ammoniak in den voedingsbodem van Dieudonné, bepaalde ik het gehalte in mengsels van verschillende ouderdom. Ik vond over het algemeen bij versche mengsels een lage ammoniak-waarde, mengsels van ongeveer een half jaar oud hadden een hooger

§ 3. De electiviteit van dunne en dikke plaat vergeleken.

Ofschoon de proeven in het vorige hoofdstuk aan de beteekenis van het ammoniak zonder meer doen twijfelen, leek het mij toch gewenscht de rol der uit het ontlede bloed afkomstige gasvormige producten — het ammoniak inbegrepen — langs een omweg te onderzoeken.

Ik koos daartoe „de methode der dikke en dunne platen", wier negatieve uitkomsten met betrekking tot de alcalescentie ik reeds vermeld heb.

Van het materiaal dat bij deze proeven telkens aan de kolf ontnomen werd, goot ik dunne en dikke platen. De dunne platen waren bestemd het resultaat weer te geven van een enting op een normale Dieudonné-plaat, terwijl de dikke platen die ongeveer 25 maal zoo dik waren en in bekerglaasjes waren uitgegoten, dienden ter weerspiegeling van den invloed dien de „gassen" bij hunne ontwijking uitoefenden op de ontwikkeling der verschillende micro-organismen.

De platen werden eerst 24 uur aan de lucht open gesteld, en voor de enting in 4 quadranten verdeeld. Den volgenden dag werd het eerste quadrant geënt.

Den daarop volgenden dag het tweede quadrant, dat dus twee dagen zijn gassen had kunnen uitdampen en aan de inwerking van het koolzuur uit de lucht blootgestaan, vóór het geënt werd.

De resultaten waren niet twijfelachtig. Van een

bijzonder schadelijken invloed van de gassen op den groei der cholera-vibrionen bleek niet veel. Want in het eenige geval waarin de V. chol. 53 op de dikke plaat geremd werd, betrof dit een plaat gegoten van een DIEUDONNÉ-mengsel vóór de sterilisatie, en dit komt practisch niet voor; men laat het bloedalkalimengsel doorgaans een half tot één uur steriliseeren.

De coligroei daarentegen vertoonde een geheel ander beeld. Bij de kortere sterilisatie's kwam zij in het geheel niet op, de platen waren nog te electief. Daarna evenwel neemt de coli-ontwikkeling geleidelijk toe op de dunne platen, terwijl zij op de dikke platen sterk in haar groei wordt geremd.

De daaropvolgende protocol toont aan dat een groei-remming heeft plaats gehad en geen absolute vernietiging; men ziet de B. coli immers langzaam opkomen, waar zij tevoren negatief was.

TABEL IX.

1° quadrant	V. chol. 53		V. chol. 89		V. aquatilis		B. coli	
	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.
vóór steriliseeren	+ matig	—	?	—	—	—	—	—
15 min. „	+	+ dun	+ zw.	—	—	—	—	—
30 min. „	+	+ „	—	—	—	—	—	—
60 „ „	+	+	+ zw.	—	—	—	+ zw.	—
2½ „ „	+	+	+ zw.	—	—	—	+ zw.	—
5 „ „	+	+	+	+ zw.	—	—	+	—
7 „ „	+	+	+	+ zw.	—	—	+	+ z.zw.

Na nog een dag staan in de 37° stoof was de uitslag als volgt:

TABEL X.

1° quadrant	V. chol. 53		V. chol. 89		V. aquatilis		B. coli.	
	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.
vóór steriliseeren	+	—	+z.zw.	—	—	—	—	—
15 min. „	+	+	+zw.	—	—	—	—	—
30 „ „	+	+ dun	—	—	—	—	—	—
60 „ „	+	+	+ dun	—	—	—	+zw.	—
$2^1/_2$ uur „	+	+	+zw.	—	—	—	+	+z.zw.
5 „ „	+	+	+	+zw.	—	—	+	+z.zw.
7 „ „	+	+	+	+zw.	—	—	+dik	+z.zw.

Het tweede quadrant had dus twee dagen gelegenheid uit te dampen vóór 't geënt werd, er passeerden dus minder gassen dan bij enting op het 1°. quadrant den dag te voren.

TABEL XI.

2° quadrant	V. chol. 53		V. chol. 89		V. aquatilis		B. coli	
	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.	dunne pl.	dikke pl.
vóór steriliseeren	+	—	?	—	—	—	—	—
na 15 min. „	+	+ dun	+z.zw.	—	—	—	—	—
„ 30 „ „	+	+ dun	—	—	—	—	—	—
„ 1 uur „	+	+ dun	?	—	—	—	—	—
„ $2^1/_2$ „ „	+	+	+zw.	—	+z.zw.	—	+	+z.zw.
„ 5 „ „	+	+	+	+z.zw.	+z.zw.	—	+	±
„ 7 „ „	+	+	+	+z.zw.	+zw.	—	+	+z.zw.

Van het mengsel dat 5 uur gesteriliseerd was, werd 10 gram genomen van de dunne en eveneens van de dikke plaat-agar, en deze ter bepaling van het ammoniakgehalte overgedestilleerd. De agar der dikke plaat werd van de bovenste laag genomen, daar hierop immers ook geënt werd. Daar reeds veel gas was ontweken kon ook geen hoog ammoniakgehalte verwacht worden. Dit bedroeg voor dunne en dikke plaat resp. 0.6 en ± 1, *de laatste dus hooger*. Van ditzelfde plaatmateriaal werd ook de alcalescentie bepaald, in beide gevallen na opsmelten op 55° C., en er werd een volkomen gelijke alcaliciteit gevonden nl. 0.4 (zie blz. 44).

Het was nu belangwekkend te onderzoeken of dit feit, de meerdere remming der niet-vibrionen, ook kon geconstateerd worden bij dikke platen, gegoten van de voorhanden oude laboratoriummengsels, voor zoover de voor deze proef benoodigde hoeveelheid bloedalkali aanwezig was.

De volgende protocol geeft het resultaat van dezen proef te zien.

Tabel XII.

MENGSEL:	V. chol. 53	V. chol. 89	B. coli	V. Dunbar	V. aquatilis	B. typhi	B. dys. Y.	B. faecalis alcaligenes	B. proteus	B. pyocyaneus	staphylococcus	V. El Tor IV	V. chol. A.
23-3-17													
dunne plaat	+ z.zw.	+ zw.	+ zw.	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+
dikke plaat.	—	+ zw.	—	+	—	+	—	—	—	+	+	+	+
18-5-17													
dunne plaat	+ z.zw.	+ zw.	+ zw.	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+
dikke plaat.	—	—	—	+	—	+	—	+	±	+	+	+	+
29-1-18													
dunne plaat	—	+ zw.	+ zw.	+	—	+	—	+ zw.	+ zw.	+	+	+	+
dikke plaat.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	+	+
24-4-18													
dunne plaat	+ z.zw.	+ zw.	—	+	—	+	—	—	—	+	+ zw.	+	+
dikke plaat.	—	+ zw.	—	+	—	+	—	+ zw.	—	+	—	+	+
14-5-18													
dunne plaat	—	—	+ zw.	+	—	+	—	—	+ z.zw.	+	+	+	+
dikke plaat.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
V 22-8-'18													
dunne plaat	+ z.zw.	+ zw.	±	+	—	+	—	+ z.zw.	—	+ zw.	—	+	+
dikke plaat.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+

Alcalescentie der mengsels (23 Januari 1919):

23—3—'17 : 0.9
18—5—'17 : 0.7
29—1—'18 : 1.9
24—4—'18 : 2.1
14—5—'18 : 2
V 22—8—'18 : 2.1

Ook hierbij een meer of minder duidelijke remming van niet-vibrionen in sommige gevallen[1]).

Uit het verschil in massa der beide platen leeren wij intusschen dat de factor die de niet-vibrionen remt zeker iets gasvormigs is. De uitslag van deze proeven zou zoowel op de uitdamping van ammoniak als van andere gassen kunnen berusten.

Nemen wij aan dat dit remmende gas in den versch bereiden DIEUDONNÉ-voedingsbodem tevens de choleravibrionen tegenhoudt dan denken wij zeker niet in de eerste plaats, of uitsluitend, aan het ammoniak, omdat onze analyses geleerd hebben dat electiviteit en ammoniakgehalte niet parallel gaan.

§ 4. TOEVOEGEN VAN AMMONIAK AAN BOUILLONAGAR EN AAN NIET-ELECTIEVE MENGSELS.

Moesten wij dus op grond onzer analyses eenerzijds den electiviteitbevorderenden invloed van het ammoniak betwijfelen, terwijl wij uit de proeven

[1]) Men vindt in deze en verdere proeven als choleracultuur thans gebruikt een V. chol. A.; als watervibrio V. Dunbar, aangezien de in het vorige jaar gebruikte culturen in tolerantie ten opzichte van het DIEUDONNÉ-medium waren teruggegaan.

met dikke en dunne plaat zeer duidelijk de werking van een gas of gassen konden vaststellen, daar lag het voor de hand de werking van ammoniak tegenover verschillende bacteriën nog eens rechtstreeks te onderzoeken.

Ik voegde dus bekende hoeveelheden ammoniak toe aan voedingsbodems van bekende samenstelling, als zoodanig en als carbonaat.

De volgende protocollen geven het resultaat dier entingen weder; alleen de beide cholerastammen, de watervibrio en een B. coli zijn geënt. Het gedrag van B. coli blijft het cardinale punt.

Ook enting van typhus zou van belang kunnen zijn; hiertoe zal later worden overgegaan.

20 November 1918.

TABEL XIII.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
V.chol.53	+	+	+	+ zw.	+z.zw.	—	—	—	—	—	—	—	c.c. $^1/_2$ N. ammonia-oplossing toegevoegd aan 4% *bouillon-agar.*
V.chol.89	+	+	+	+	+z.zw.	—	—	—	—	—	—	—	
V.aquatilis	+	+	+	+z.zw.	—	—	—	—	—	—	—	—	
B.coli . .	+	+	+	+	+z.zw.	—	—	—	—	—	—	—	

TABEL XIV.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
V.chol.53	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	c.c. $^1/_2$ normaal ammonium carbonaat-oplossing; toegevoegd aan 4 % bouillon-agar.
V.chol.89	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
V.aquatilis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
B.coli. .	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

Het ammonium-carbonaat gaf dus, toegevoegd aan platen die 2 uur aan de lucht gedroogd waren, een sneller ophouden van groei dan het ammoniak.

Het blijkt dus ook hier, dat, evenals bij loogtoevoeging, er met bouillon-agar geen goede electieve plaat te verkrijgen is. Het ammoniak werkt in dit milieu niet electief.

Ik ging nu over tot het gebruik van bloedalkalimengsels, en bezigde eerst het mengsel dat met koolzuur was doorgeleid. Hiermede werkende bleek toevoegen van 1 c. c. loog of ammonia of ammonium-carbonaat $^1/_2$ N. opl. reeds voldoende om den coligroei te doen remmen.

Voorzichtigheidshalve goot ik nu een contrôleplaat, waarbij bleek, dat ondanks zeer laag looggehalte, toch geen B. coli opkwam (reeds vroeger vermeld). Ik nam dus een ander mengsel nl. VII, dat vroeger bereid was uit 100 c. c. bloed, 70 c. c. normaal kaliloog oplossing en 30 c. c. aq. dest.

Dieudonné-mengsel VII (10 Juni 1918 bereid). Toevoeging van opklimmende hoeveelheden loog, ammonia en ammonium-carbonaat in $^1/_2$ norm.-oplossing.

Tabel XV.

22 November 1918:

	V. chol. 53	V. chol. 89	V. aquatilis	B. coli.
Contrôleplaat	+ dik	+	—	+
+ 0.2 c. c. loog	+	—	—	—
+ 0.4 c. c. „	+	—	—	—
+ 0.6 „	+	—	—	—
+ 0.8 „	+	—	—	—
+ 1 „	+	—	—	—
+ 0.2 c. c. ammonia . .	+	+	—	+
+ 0.4 „ . .	+	—	—	+
+ 0.6 „ . .	+	—	—	+ zw.
+ 0.8 „ . .	+	—	—	+ z. zw.
+ 1 „ . .	+	—	—	—
+ 0.2 ammon. carbonaat	+ z. dik	+	—	+
+ 0.4 „	+ z. dik	—	—	+
+ 0.6 „	+ z. dik	—	—	—
+ 0.8 „	+ z. dik	—	—	—
+ 1 „	+ z. dik	—	—	—

De platen zijn geënt na vast worden, d. i. na $^1/_2$ uur staan aan de lucht. Er kan niet verwacht worden dat de alcalescentie der ammoniakplaten bij de enting dezelfde is als van de loogplaten. Gedurende het staan aan de lucht ontsnapt ammonia, niet weinig bevorderd bovendien door het toevoegen van den kokenden agar.

Dat de V. chol. 53 bij toevoegen van ammoniumcarbonaat zich zooveel beter ontwikkelde dan op de overige platen, was opmerkelijk; het verschil was duidelijk, waarom ik aanleiding vond: zeer dik, er bij aan te teekenen.

Ik kreeg dus bij het gebruik van deze vier stammen een betere electieve plaat. Het bloedalkalimengsel was een half jaar oud. Ik wijzigde nu de uitvoering der proef eenigszins; het ammoniak werd niet meer toegevoegd, maar in plaats daarvan een mengsel van gelijke deelen loog en ammonium carbonaatopl., omdat in het DIEUDONNÉ-mengsel eveneens loog en ammoniak te zamen werken.

Van de nu volgende vijf mengsels werd de alcalescentie bepaald, en het ammoniak overgedestilleerd; hieronder volgen de waarden die daarbij gevonden zijn, tevens is de ouderdom mede aangegeven.

	Mengsel:	Alcalescentie:	Ammoniak-gehalte:	Ouderdom in maanden:
	23—3—1917 . .	0.8	1.2	21
	18—5—1917 . .	0.7	2.2	19
	29—1—1918 . .	1.7	6.6	11
	14—5—1918 . .	2.2	7.2	7
V	22—8—1918 . .	2.3	4.1	4

De resultaten van bovenbeschreven proefnemingen met drie dezer mengsels zullen in de volgende protocollen worden getoond.

Ook bij ESCH-platen [1]) paste ik de loog en ammoniaktoevoeging toe, maar ik had hiermede nog minder resultaat.

---

[1]) Gebruikt werd het Haemoglobine Solubile van de Coöperatieve Apothekers-Vereeniging (De onderlinge pharmaceutische groothandel Nieuwe Gracht, Utrecht).

Mengsel 23-3-1917, niet onder paraffinum liquidum bewaard.
Alcalescentie 0.8.
Ammoniakgehalte 1.2.
Datum van de proef: 18 December 1918.

TABEL XVI.

	V. chol. nº. 53	V. chol. nº. 89	B. coli	V. aquatilis	B. typhi	Staphylococcus	B. proteus	B. pyocyaneus	B. faecalis alcaligenes
Contrôle plaat	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.2 c.c. 1/2 n. loog. . .	+	+ zwak	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.4 „ 1/2 „ „ . .	+	+ zwak	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.6 „ 1/2 „ „ . .	+	+ zwak	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.8 „ 1/2 „ „ . .	+	—	±	—	+	+ zwak	—	+	—
+ 1 „ 1/2 „ „ . .	+	—	—	—	+	+ zwak	—	+	—
+ 0.2 c.c. 1/2 n. amm. carb.	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.4 „ 1/2 „ „ „	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.6 „ 1/2 „ „ „	+	+	+	—	+ dun	+ dun	+	+	—
+ 0.8 „ 1/2 „ „ „	+	—	—	—	—	—	+	+	—
+ 1 „ 1/2 „ „ „	+ dun	—	—	—	—	—	+	+	—
+ 0.1 loog + 0.1 amm. carb.	+	+	+	—	+	+	+	+	+
+ 0.2 „ + 0.2 „ „	+	+	+	—	+	+ dun	+	+	+
+ 0.3 „ + 0.3 „ „	+	+	+	—	+	+ dun	+	+	+
+ 0.4 „ + 0.4 „ „	+	+	+	—	+	+ dun	+	+	—
+ 0.5 „ + 0.5 „ „	+	+	+	—	+	+ dun	+	+	—

Mengsel 14-5-18, onder paraffinum liquidum bewaard.
Alcalescentie: 2.2.
Ammoniakgehalte: 7.2.
Datum van de proef: 18 December 1918.

TABEL XVII.

	V chol. nº. 53	V. chol. nº. 89	B. coli	V. aquatilis	B. typhi	staphylococcus.	B. proteus vulgaris	B pyocyaneus	B. faecalis alcaligenes
Contrôle plaat	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.2 c.c. ½ n. loog. . .	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.4 „ ½ „ „ . . .	+	+ zwak	+ zwak	—	+	+	+ zwak	+	—
+ 0.6 „ ½ „ „ . . .	+	+ zwak	+ zwak	—	+	+	+ zwak	+	—
+ 0.8 „ ½ „ „ . . .	+	+ z.zw.	+ z.zw.	—	+	+	+ zwak	+	—
+ 1 „ ½ „ „ . . .	+	—	—	—	+	+	—	+	—
+ 0.2½ n. ammon. carbon.	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.4 „ „ „	+	+ zwak	+ zwak	—	+ zwak	+	+	+	—
+ 0.6 „ „ „	+	+ zwak	+ zwak	—	+ zwak	+	+	+	—
+ 0.8 „ „ „	+	+ z.zw.	—	—	—	+	+	+	—
+ 1 „ „ „	+ zwakk.	—	—	—	—	+	+ zwak	+	—
+ 0.1 loog + 0.1 amm. carb.	+	+	+	—	+	+	+	+	+
+ 0.2 „ + 0.2 „ „	+	+ zwak	+	—	+ zwak	+	+	+	+
+ 0.3 „ + 0.3 „ „	+	+ z.zw.	—	—	+ zwak	+	+	+	—
+ 0.4 „ + 0.4 „ „	+	±	—	—	+ z.zw.	+	+	+	—
+ 0.5 „ + 0.5 „ „	+	—	—	—	—	+	+	+	—

Mengsel 29-I-1918 bewaard onder paraffinum liquidum.
Alcalescentie: 1.7.
Ammoniakgehalte: 6.6.
Datum van den proef: 18 December 1918.

TABEL XVIII.

	V. chol. No. 53	V. chol. No. 89	B. coli	V. aquatilis	B. typhi	staphylococcus	B. proteus	B. pyocyaneus	B. faecalis alcaligenes
Contrôleplaat	+	+	+	—	+	+	+	+	+
+ 0.2 c. c. 1/2 n. loog . .	+	+	+	—	+	+	+	+	+ zwak
+ 0.4 „ 1/2 „ „ . .	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.6 „ 1/2 „ „ . .	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.8 „ 1/2 „ „ . .	+	+ zwak	+ zwak	—	+	+	—	+	—
+ 1 „ 1/2 „ „ . .	+	+ z. zw.	+ z. zw.	—	+	+	—	+	—
+ 0.2 1/2 ammon. carb. . .	+	+	+	—	+	+	+	+	—
+ 0.4 1/2 „ „ . .	+	+	+	—	+ zwak	+	+	+	—
+ 0.6 1/2 „ „ . .	+	+ zwak	+ zwak	—	—	+	+	+	—
+ 0.8 1/2 „ „ . .	+	+ zwak	+ z. zw.	—	—	+	+	+	—
+ 1 1/2 „ „ . .	+	—	—	—	—	+ zwak	+ zwak	+ zwak	—
+ 0.1 loog + 1 amm. carbon.	+	+	+	—	+	+	+	+	+ zwak
0.2 „ + 0.2 „ „	+	+	+	—	+	+	+	+	+ zwak
+ 0.3 „ + 0.3 „ „	+	+	+	—	+	+	+	+	+ zwak
+ 0.4 „ + 0.4 „ „	+	+ zwak	+ zwak	—	+ zwak	+	+	+	—
0.5 „ + 0.5 „ „	+	+ zwak	—	—	—	+	+	+	—

Uit deze proeven blijken verschillende dingen. B. typhi vertoont op alle drie mengsels hetzelfde beeld: een bijzondere gevoeligheid voor ammonium-carbonaat. Op deze platen worden de typhusbacillen veel eerder in hun groei belemmerd.

Verder is het gedrag van B. faecalis alcaligenes zeer eigenaardig. Zij worden bijna overal geremd; alleen op de platen met gemengde loog en ammonium-carbonaat toevoeging blijken zij plotseling positieve entingen te geven.

In geen der gevallen verder is een behoorlijk electieve plaat verkregen, wel het minst juist bij de platen met gemengde loog en ammonium carbonaat toevoeging.

Een voortgezette toevoeging van deze beide oplossingen bleek dus noodig te zijn. Daarbij ging ik tot 2 c.c., met slechts één overgang nl. 1.5 c.c., en beperkte die toevoeging alleen tot loog en ammonium-carbonaat-oplossing $^1/_2$ normaal, met achterwege laten van de combinatie dezer beiden, omdat dit toch meer onvoldoende resultaten opleveren zou.

In deze proeven is V. cholerae 53 door V. cholerae A vervangen.

Tabel XIX.

MENGSEL:	V. chol. nº. 89	B. coli	V. dunbar	B. typhi	B. dyss. Y	B. faecalis alcalig.	B. proteus	B. pyocyaneus	Staphylococcus	V. el Tor nº. IV	V. chol. A
23-3-1917											
Contrôle	+ zw.	+ zw.	+	+	—	+	+	+	+	+	+
+ 1 c.c. 1/2 n. loog	—	—	+	+	—	+ z.zw.	+ z.zw.	+ zw.	+ zw.	+	+
+ 1.5 „ 1/2 „ „	—	—	+	+ zw.	—	+ z.zw.	—	—	—	+	+
+ 2 „ 1/2 „ „	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+ zw.
+ 1 „ 1/2 „ ammon. carbonaat	—	±	+	+	—	—	+ zw.	+	+ zw.	+	+
+ 1.5 „ 1/2 „ „ „	—	—	+	+	—	—	+ zw.	+	—	+	+
+ 2 „ 1/2 „ „ „	—	—	+ z.zw.	+ zw.	—	—	+ z.zw.	+ zw.	—	+ zw.	+ zw.
14-5-1918											
Contrôle	—	+ zw.	+	+	—	±	+ z.zw.	+	+	+	+
+ 1 c.c. 1/2 n. loog	—	—	+	+ zw.	—	—	—	—	—	+	+
+ 1.5 „ 1/2 „ „	—	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+ zw.
+ 2 „ 1/2 „ „	—	—	+ z.zw.	—	—	—	—	—	—	+	±
+ 1 „ 1/2 „ ammon. carbonaat	—	±	+	+	—	+ zw.	+	+	+ zw.	+	+
+ 1.5 „ 1/2 „ „ „	—	—	+ zwk.	+	—	±	+ zw.	+	+ zw.	+	+
+ 2 „ 1/2 „ „ „	—	—	—	—	—	—	—	+ zw.	—	+ z.zw.	+ z.zw.
29-1-'18											
Contrôle	+ zw.	+ zw.	+	+	—	+ zw.	+ zw.	+	+	+	+
+ 1 c.c. 1/2 n. loog	—	—	+	+	—	—	—	+ zw.	—	+	+
+ 1.5 „ 1/2 „ „	—	—	+	+	—	—	—	+ zw.	—	+	+
+ 2 „ 1/2 „ „	—	—	+ z.zw.	—	—	—	—	—	—	+ zw.	±
+ 1 „ 1/2 „ ammon. carbonaat	—	+ z.zw.	+	+	—	—	+ zw.	+	+ z.zw.	+	+
+ 1.5 „ 1/2 „ „ „	—	—	+ zw.	+ zw.	—	—	+ zw.	+	±	+	+
+ 2 „ 1/2 „ „ „	—	—	±	+ z.zw.	—	—	+ z.zw.	+ z.zw.	—	+ zw.	±

Uitvoering van de proef: 22 Januari 1919.

Bekijken wij deze eindresultaten bij verder doorgevoerde toevoeging van $^1/_2$ normaaloplossing van natronloog en ammoniumcarbonaat, dan kunnen zij niet bevredigen.

Terwijl in sommige gevallen werkelijk alleen vibrionen opkomen, zien wij deze toch maar zwakjes groeien, en dat terwijl een suspensie van een reincultuur werd gebezigd.

In andere gevallen zien wij ook positieve resultaten van de enting van B. typhi, B. proteus vulgaris en B. pyocyaneus. Er is dus geen eenheid in de uitkomsten.

Ook deze proeven leiden dus tot de slotsom waartoe wij reeds neigden op grond van onze ammoniak-analyses bij versche en oude mengsels: in het ammoniak erkennen wij niet het gas dat uitsluitend of in hoofdzaak de elektiviteit van den voedingsbodem van Dieudonné bepaalt.

§ 5. Het steriliseeren en bewaren van bloedalkali-mengsels in open en toegesmolten buizen.

Om te trachten op nog andere wijze den invloed van gassen te leeren kennen, nam ik eenige proeven, waarbij aan gassen het ontwijken belet werd.

Een groot aantal reageerbuizen werden gevuld met een Dieudonné-mengsel, en de helft er van daarna dichtgesmolten. Allen werden nu gesteriliseerd, maar niet even lang. Na 15 minuten 1 uur, 2 uur, 4 uur en 7 uur, werden telkens twee buizen

van elke soort uit de Pappiniaansche pot genomen en bewaard.

Den volgenden dag werden platen gegoten, welke na 24 uur aan de lucht blootgesteld te zijn, geënt werden. Ook de alcalescentie van de bloed-alkali-mengsels in de open en toegesmolten buizen heb ik bepaald, waarbij geen verschil werd gevonden.

Het resultaat der enting gaf geen verschil te zien. Steeds kwamen alleen de vibrionen op; wel kreeg ik den indruk dat El Tor IV en V. chol. A. op de platen, gegoten van het bloedmengsel uit de dichtgesmolten buizen, minder welig groeiden. Na een tweetal weken werden de overblijvende buizen aangesproken en platen gegoten, die nu 4 uur aan de lucht werden opengesteld voor de enting. (Zie tabel XX).

Tabel XX.

Platen, gegoten van een Dieudonné-mengsel na:	B. coli	B. typhi	B. dysent. y.	staphylo-kokken	B. proteus	B. pyocya-neus	B. faecalis alcaligenes	V. aqua-tilis	V. Dunbar	V. el Tor IV	V. el Tor A	V. chol. 89	V. chol. 53	V. chol. A
15 min. steriliseeren														
open buis	—	+ z.zw.	—	—	—	—	—	—	±	—	+ zw.	—	—	+ spoor
toegesmolten buis. .	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	+ z.zw.	—	—	+ spoor
1 uur steriliseeren														
open buis	—	+ zw.	—	—	—	—	—	—	+ zw.	—	+ zw.	—	—	+ spoor
toegesmolten buis. .	—	±	—	—	—	—	—	—	+ zw.	—	+ zw.	—	—	+ spoor
2 uur steriliseeren														
open buis	—	+ dun	—	—	—	—	—	—	+ zw.	—	+	—	—	+ z.zwak
toegesmolten buis. .	—	+ zw.	—	—	—	—	—	—	+ zw.	—	+ zw.	—	—	+ spoor
4 uur steriliseeren														
open buis	±	+	—	—	—	+	—	±	+	—	+	—	—	+
toegesmolten buis. .	—	+ dun	—	—	—	+ z.zw.	—	—	+ dunn.	—	+	—	—	+ zwak
7 uur steriliseeren														
open buis	±	+ dik	—	—	—	+	—	±	+	—	+	—	—	+
toegesmolten buis. .	—	+	—	—	=	+ z.zw.	—	—	+	—	+	—	—	+ iets zw.

De platen zijn 4 uur vóór enting aan de lucht blootgesteld geweest.

Overziet men de proeven met de open buizen dan blijkt dat het mengsel gedurende de voortzetting van het steriliseeren geleidelijk minder electief wordt. Groeiden aanvankelijk zelfs de vibrionen nog zwakjes, na 4 en 7 uur ziet men allerhande bacteriën opgekomen.

Het mengsel uit de gesloten buizen vertoonde met dat der open buizen een duidelijk verschil; zoowel de vibrionen als de niet-vibrionen bleken veel sterker geremd. Het komt mij voor dat ook deze proeven de vergelijkingsproeven met dikke en dunne platen bevestigen en aantoonen dat de bacterie-remmende factor, die tevens de electiviteit beheerscht, van gasvormigen aard is.

Men ziet er tevens uit dat het langdurig steriliseeren als zoodanig ongunstigen invloed heeft op de electiviteit; met de vibrionen komen in de lang gesteriliseerde mengsels tevens de andere in de proef gebezigde organismen meer of minder op.

HOOFDSTUK VI.

Slotopmerkingen.

In de voorgaande bladzijden hebben wij den voedingsbodem van DIEUDONNÉ van verschillende zijden bekeken; wij hebben ruimschoots gelegenheid gehad de voortreffelijke eigenschappen van dit medium te leeren kennen, doch in zijn wezen door te dringen om er de onvolkomenheden, die het nog aankleven, op te heffen, is ons niet gelukt.

De bloed-alkali-agar van DIEUDONNÉ is slechts op een zeker tijdstip nà de bereiding, en vervolgens gedurende zeker tijdperk een voedingsbodem, die het ideale benadert; dán groeit op de pas gegoten plaat alleen de vibrio cholerae welig, de meeste watervibrionen reeds minder, B. coli, B. pyocyaneus, B. faecalis alcaligenes, enz, in het geheel niet.

Maar vóór dit punt van hoogste electiviteit ten opzichte van den V. cholerae ligt een periode, waarop de pas gegoten plaat eerst na 24 uur uur of korter bruikbaar is; en later zal er een oogenblik komen waarop allerlei niet-vibrionen op de bloed-alkali-agar kunnen groeien. In het mengsel van DIEUDONNÉ ontbreekt dus blijkbaar het evenwicht. Er schrijdt

iets in voort, en tot dat bewegelijke houdt de electiviteit een nauw verband.

Op verschillende wijzen heb ik getracht dat bewegelijke te leeren kennen. In de eerste plaats onderzocht ik de alcalescentie; ik vond deze inderdaad afnemend, maar met de electiviteit hield zij geen rechtstreeksch verband. Alcalescentiewaarden van electieve mengsels lagen niet zelden ver onder die van niet-electieve mengsels. En evenmin gelukte het bouillonagar electief te maken ten opzichte van V. cholerae door toevoegen van loog.

Toch blijkt de beteekenis der alkaliën aanstonds zoodra er bloedbestanddeelen in het spel zijn gebracht. Hun werking bestaat dus zeker, doch is niet in de eerste plaats een rechtstreeksche.

Bloed en alkali bepalen gezamenlijk de electiviteit; deze komt tot stand door de producten van de door het loog ontlede bloedbestanddeelen.

Dat deze producten gasvormig zijn, lijdt m.i. geen twijfel. De door mij toegepaste vergelijkingsmethode der „dikke en dunne platen" toonden dit genoegzaam aan. Zoowel bij oude als bij versche mengsels was de invloed van dikte der laag op de niet-vibrionen onmiskenbaar, hetgeen aan niets anders dan aan den invloed van een ontwijkend gas is toe te schrijven.

Dat dit gas het ammoniak zou zijn heb ik niet waarschijnlijk kunnen maken. In de eerste plaats moet het treffen dat de ammoniak-kromme zoowel bij een reeks mengsels van verschillenden ouderdom, als bij eenzelfde mengsel tijdens langdurige sterilisatie

eerst stijgt, dan daalt, m.a.w. een top vertoont, die de electiviteits-kromme mist. Ammoniakgehalte en electiviteit gaan dus niet samen.

Deze opvatting vindt steun in den uitslag van proeven waarbij ammoniak bij bouillonagar wordt gevoegd zonder duidelijke electiviteit ten opzichte van den V. cholerae te verkrijgen. De toevoeging van ammoniak aan bloedmengsels had weliswaar meer resultaat, doch hierdoor verhoogt men tevens de alcalescentie, hetgeen wij reeds uit de loogproeven weten, dat begunstigend op de electiviteit werkt.

Welk ander gas de electiviteit van den voedingsbodem van DIEUDONNÉ bepaalt, heb ik niet getracht te benaderen.

Uit de proeven van PILON en van mij zelven weten wij slechts dat het door koolzuur in zijn werking wordt geneutraliseerd. Plaatst men versche platen in koolzuuratmosfeer, dan worden zij aanstonds bruikbaar, zoo vond PILON; d.w.z. het bacteriegroei remmende gas wordt in zooverre geneutraliseerd dat het den V cholerae niet meer hindert.

Leidde ik koolzuur door het mengsel, dan ging de electiviteit gansch verloren. Wel opmerkelijk was daarbij dat de bloedalkali-agar zich weer herstelde, d.w.z. opnieuw de factor in zich deed ontstaan die de electiviteit beheerscht.

Uit mijn proefnemingen komt dus duidelijk naar voren dat in het DIEUDONNÉ-mengsel processen aan den gang zijn, die voeren naar een evenwicht, dat samenvalt met een algeheel verlies der electiviteit

En het komt ons voor dat het gebeurende, het bewegelijke, juist het wezenlijke is in het ontstaan en het verdwijnen der electieve werking.

Volgens deze beschouwing moet het hopeloos zijn te trachten een DIEUDONNÉ-mengsel samen te stellen, dat ten eeuwigen dage zijn electief vermogen ten opzichte van den cholera-vibrio zal blijven behouden.

Voor de praktijk kan men minder pessimistisch zijn. Voor de praktijk komt het er op aan op ieder oogenblik te beschikken over een DIEUDONNÉ-mengsel dat aanstonds bruikbaar is, en toch nog electief.

Wij zullen dus alles in het vermogen stellen om de electiviteitsfactor — het onbekende gas — zoo min mogelijk te verliezen en tegen schadelijke invloeden te vrijwaren.

VAN LOGHEM en NIEUWENHUIJSE deden reeds een poging in deze richting door de schadelijke inwerking van het koolzuur door afsluiting met een laag paraffinum liquidum te voorkomen.

Ik heb hun uitkomsten kunnen bevestigen, al verloren mijn mengsels ook spoediger hun electiviteit dan de hunne, misschien door het gebruik van kleinere quanta en het bewaren bij een hoogere temperatuur.

In elk geval staat het vast dat ook het paraffinum liquidum het mengsel niet oneindig lang goed houdt: de ontleding schrijdt voort en wellicht ontwijken de gasvormige ontledingsproducten tenslotte door het paraffine, zij het dan ook (evenals het

ammoniak), aanmerkelijk door de laag van het koolwaterstof vertraagd.

Voor de praktijk beschikken wij dus reeds over een middel dat in het epidemielaboratorium groote diensten kan bewijzen. Bewaart men eenige groote kolven met DIEUDONNÉ's bloed-alkalimengsel, goed afgesloten en bij lage temperatuur, en vervangt men ze elke drie maanden, dan beschikt men steeds over materiaal dat voor het herkennen van eerste of sporadische gevallen, of voor het snel uitvoeren van massa-onderzoekingen uitnemend bruikbaar is.

Dat op deze wijze reeds het beste op practisch gebied bereikt zou zijn kan ik niet gelooven; een nadere kennis der in dit proefschrift bestudeerde omzettingen zal hiertoe zeker kunnen bijdragen.

Over mijn eigen proefnemingen in deze richting, in het bijzonder over den invloed van de temperatuur op de bedoelde ontledingsprocessen, hoop ik later nog iets te kunnen meedeelen.

LITTERATUUR

Arens: Münch. med. Wochenschr. 1893 blz. 190.

Aronson: Eine neue Methode der bakteriologischen Choleradiagnose. Deut. med. Woch. 1915, 26 Aug. Bd. 41 n⁰. 35, 9 Sept. Bd. 41 n⁰. 37.

Baumgarten und Lange-Zuckerkandl: Ueber elektive Cholera-nährböden. Zeitschr. für Hyg. u. Inf. 1917, 3 Mei blz. 389—406.

Baerthlein und Gildemeister: Ueber Cholera-elektivnährböden. Centr. f. Bakt. etc. 1915. Abt. I. Orig. Bd. 76 Heft 7 blz. 550—607.

Boccalari en Olivi: Ref. Trop. Dis. Bull. 1918.

Boetticher: Die bakteriologische Choleradiagnose, unter besonderer Berücksichtigung der von Aronson und Lange neuerdings angegebenen Choleranährböden. Deut. med. Woch. 1915 28 Oct. Bd. 41 n⁰. 44 blz. 1303—1305.

Castelli & Vigano: Ref. Tropic. Dis. Bull. 1916.

Crendiropoulo et Panayotatou: Sur un nouveau milieu pour le diagnostic du choléra. Centr. f. Bakt. etc. Bd. LV blz. 248.

Dieudonné: Blutalkaliagar, ein Elektivnährboden für Choleravibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Abt. I Orig. Band 50 blz. 107.

Esch: Zum bakteriologischen Choleranachweise mittels der Blutalkalinährböden. Deut. med. Woch. 1910 blz. 559.

Fuerst: Lentzscher Blutalkalitrockenpulver zur Bereitung von Choleranährböden in Feldlaboratoriën. Deut. med. Woch. 1916 24 Febr. n⁰. 8 blz. 226—227.

Fügner: Ueber den modifizierten Dieudonné'schen Choleranährböden von Hofer-Hovorka. Centr. f. Bakt. etc. 1 Abt. Orig. Heft $^3/_4$ Bd. 74 blz. 354—365.

Glaser und Hachla: Ist der Dieudonné'sche Nährboden nur für Choleravibrionen elektiv? Centr. f. Bakt. etc. Bd. LVII blz. 371.

Ghedini: Ref. Tropic. Dis. Bull. 1916.

Gildemeister und Baerthlein: Beitrag zur Cholerafrage. Münch. med. Woch. 1915, 25 Mei Bd. 62 n⁰. 21 blz. 705—708.

Goldberger: Some new Cholera-Selective Media-Treasure Dept. U. S. Public Health Service, Hygienic Laboratory Bull. n⁰. 91, 1913 Dec. blz. 19—39 Ref. Tropic. Dis. Bull.

Hall: Ist es möglich einen sofort brauchbaren Dieudonné-agar herzustellen ohne die Zusammensetzung des Substrates zu veränderen? Berlin. kl. Woch. 1916, 28 Febr. n⁰. 9 blz. 217—219.

Hachla und Holabut: Beitrag zur Frage elektiver Nährböden für Cholera-vibrionen. Centr. f. Bakt. I Ab. etc. Orig. Bd. 52. blz. 299.

Heim: Zum Nachweise der Choleravibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XXX blz. 570.

————: Meine Anteile an der bacteriologischen Cholera-diagnose. Centr. f. Bakt. etc. Bd. LIII blz. 557.

————: Ueber Pneumoniecoccen. Deutsche med. Woch. 1907 blz. 1587.

————: Lehrbuch der Bakteriologie 1911 blz. 385—387.

Hofer und Hovorka: Versuche zur elektiven Ausgestaltung des Dieudonné'schen Cholera-nährbodens. Centr. f. Bakt. 1913. I Abt. Orig. Bd. 71 Heft 1 blz. 103—112.

Huntemüller: Der Dieudonné'sche Blutalkali-Agar. Centr. f. Bakt. ect. Bd. 50 blz. 107.

Kabeshima: Ueber eine Hämoglobin-Extrakt-Soda-agar als Elektivnährboden für Choleravibrionen. Centr. f. Bakt. etc. I Abt. Orig. Bd. 70 blz. 202.

Koehlisch und Otto: Vergleichende Untersuchung und Versuche mit einigen Cholera-elektivnährböden. Ein neuer Elektivnährboden. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 1915 26 Oct. n⁰. 3, blz. 431—446.

Kolle und Hetsch: Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten deel I.

Kolle und Wassermann: Handbuch der pathogenen Microorganismen Bd. IV blz. 1—110. 2e Aufl.

Krumwiede und Pratt: Dahlia Agar als Unterscheidungsmittel zwischen Cholera- und andere Vibrionen. Centr. f. Bakt. 1913 etc. I Abt. Orig. Bd. 68 blz. 562—566.

C. Lange: Ein neuer Nährboden für die Choleradiagnose. Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. 1916, pg. 138—153.

Lange: Ein neuer Nährboden für die Choleradiagnose. Deut. med. Woch. 1915, 16 Sept. Bd. 41 n°. 38 blz. 1119—1120.

Laubenheimer: Der Dieudonné'sche Blutalkaliagar. Centr. f. Bakt. etc. Bd. 52 blz. 294.

v. Lingelsheim: Zur Frage der Verwendbarkeit alkalischer Blutnährböden für die praktische Choleradiagnose. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 76. Heft $^2/_3$ pg. 108—110.

Van Loghem: Opmerkingen over versnelde Choleradiagnostiek. Ned. T. v. Geneesk. 8 Sept. 1917 blz. 916.

William Mansfield Clark and A. Lubs: The calorimetric determination of hydrogen ionconcentration and its applications in bacteriology. Journal of Bact. 1917 n°. 6.

Marassini: Ref. Tropic. Dis. Bull. 1916.

Neufeld und Woithe: Ueber elective Choleranährböden, insbesondere den Dieudonné'schen agar. Arb. a.d. Kais. Ges. Bd. XXXIII blz. 605.

Pilon: Academisch Proefschrift, Amsterdam, 1911.

Sobel: Praktische Nährböden zur Diagnose von Cholera, Typhus und Dysenterie. Deut. med. Woch. 1915, 30 Dec. n°. 53 blz. 1573.

Seiffert und Bamberger: Elektive Cholera-nährböden. Münch. med. Woch. 1916, Bd. 63 11 April n°. 15 blz. 527—528.

Stern: Vergleichende Untersuchungen mit festen Cholera-elektiv-nährböden. Ergänzung zur Aronsonschen Methode. Wiener klin. Woch. 1915 16 Dec. Bd. 28 n°. 50 pg. 1383—1385.

Scheuermann und Fellmer: Zur bakteriologischen Choleradiagnose. Deut. med. Woch. 1915, 30 Sept. Bd. 41 n⁰. 40 blz. 1183—1184.

Sineffund Drosdowitsch: Prof. Dieudonné's Blutalkaliagar. Centr. f. Bakt. etc. Bd. 52 blz. 429.

Stokvis: Eenige proefnemingen met de alkalische bloed-agar-agar van Dieudonné. Ned. T. v. Geneesk. 1910 1⁰. helft n⁰. 2 blz. 85.

Teague and Travis: A new differential Culture Medium for the Choleravibrio Jl. of Inf. Dis. 1916, 18 Juni, n⁰. 6, blz. 601—605.

Volpino: Ref. Tropic. Dis. Bull. 1916.

Zlatogoroff: Zur Frage der Diagnostik der Choleravibrionen. Centr. f. Bakt. etc. Bd. XLVIII blz. 684.

DRUK VAN J. H. DE BUSSY, AMSTERDAM